

Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências Biológicas  
Departamento de Farmacologia

Karla Lorena Guarido

Vasopressina no choque séptico: hiper-reatividade  
vascular renal associada ao aumento da atividade da via  
de sensibilização ao cálcio Rho-A/Rho-quinase

Florianópolis

2016



Karla Lorena Guarido

Vasopressina no choque séptico: hiper-reatividade  
vascular renal associada ao aumento da atividade da via  
de sensibilização ao cálcio Rho-A/Rho-quinase

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

**Orientador:** Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Guarido, Karla Lorena

Vasopressina no choque séptico : hiper-reatividade vascular renal associada ao aumento da atividade da via de sensibilização ao cálcio Rho-A/Rho-quinase / Karla Lorena Guarido ; orientador, José Eduardo da Silva Santos - Florianópolis, SC, 2016.  
154 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Sepsis. 3. Vasopressina. 4. Leito Vascular Renal. 5. Via Rho-A/Rho-quinase. I. da Silva Santos, José Eduardo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.





*Dedico este trabalho aos meus pais que mais uma vez me apoiaram incondicionalmente na busca pelos meus sonhos.*

*Também dedico a todos que de fato contribuíram para sua realização.*





*“O sucesso nasce do querer, da determinação e da persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

***José de Alencar***



## **Agradecimentos**

À Deus pela sabedoria, discernimento e força nos momentos nos quais achei que não seria mais capaz.

Aos meus pais, Sueli e Edmur, pelo apoio incondicional nestes 6 anos intensos de estudo. Eles são minha base, meus pés, e me dão o equilíbrio emocional para correr atrás dos meus sonhos. Amo vocês. E à minha irmã e sobrinhos, pelas palavras de carinho e conversas amigáveis. Sem minha família nada sou.

Ao André que entrou na minha vida em um momento em que não esperava encontrar alguém que me completasse tanto e que hoje tem um lugar fundamental na minha vida. Obrigada pelo seu apoio e incentivo. Te amo.

Ao Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos por todos esses anos de colaboração. Foram dias cansativos e puxados, mas sempre com seu apoio e motivação. Obrigada pela contribuição científica e pelos conselhos, os levarei para onde for.

Aos professores membros da banca de defesa desta tese: Prof. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia; Prof. Dra. Ana Durce Oliveira da Paixão; Prof. Dr. Giles Alexander Rae; Prof. Dra. Áurea Elizabeth Linder; Prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger; e Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi. Agradeço a disponibilidade de tempo que gastaram para a correção dessa tese e contribuição para meu crescimento científico.

À Adriane Madeira pela amizade conquistada a cada dia e por sempre estar disposta a ajudar a quem precisa. Você e sua família (Paulo e Thaisa) estenderam a mão para mim e sou muito grata por tudo. És uma amiga que vou levar para vida.

Aos amigos que a vida científica me deu: Thi, Pri, Lucas e Nani. Os dias de laboratório não seriam os mesmos sem vocês. Cada um fez parte de uma etapa importante a ser conquistada.

Mas o bom é saber que quando isso tudo acabar ainda irá restar a amizade que dedicamos uns aos outros.

Aos colegas do LabCardio: Ronald, Rene, Gabriel, Rita, Angélica, Danillo, Daiana e Ruy, pelas colaborações e crescimento coletivo. E claro pela descontração diária.

Aos demais colegas do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, em especial à turma de 2012 (Paulo e Ana Carol), e aos que contribuíram para o desenvolvimento desta tese.

Aos demais professores do programa, em especial Prof. Dr. Jamyl Assreuy e à Prof. Dra Áurea Elizabeth Linder, pelo convívio e a aprendizado na área de cardiovascular, e aos servidores do departamento pela dedicação aos alunos.

Às agências de fomento: CAPES, CNPq e FAPESC.

Aos animais, por doarem a vida para a realização deste estudo.

## Resumo

O uso da vasopressina (AVP), em pequenas doses e associada à noradrenalina, tem sido preconizado durante a sepse. Isso porque a vasopressina tem um potente efeito vasoconstritor e seu uso, em altas concentrações, pode causar constrição disseminada e baixa perfusão tecidual, agravando a falência orgânica causada por esta condição. Neste contexto, faz-se necessário entender o efeito sistêmico e local da administração de AVP em diferentes estágios da sepse. Já foi demonstrado o envolvimento da via da Rho-A/Rho-quinase na reatividade a alguns vasoconstritores, dentre eles a própria vasopressina, a fenilefrina e a noradrenalina. Porém pouco se sabe se essa via é crucial nas alterações de reatividade à AVP descritas durante o choque séptico. Assim, utilizando o modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP), nós avaliamos a reatividade vascular sistêmica e renal frente a exposição à AVP além de investigar a participação da via clássica do cálcio, ativada por receptor acoplado à proteína Gq, e a via Rho-A/Rho-quinase na reatividade à vasopressina na sepse. Os animais submetidos à CLP apresentaram hipotensão, taquicardia, além de alterações na função renal e hematológica. A partir destes resultados preliminares, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: controle; CLP 6 horas; CLP 18 horas; e CLP 48 horas. A avaliação *in vivo* do efeito pressórico e de alterações do fluxo sanguíneo renal induzidos pela administração de AVP revelou um perfil hiporreativo na fase inicial, retornando à reatividade similar ao controle entre 18 e 48 horas após a indução da sepse por CLP. A avaliação por laser Doppler mostrou que a redução do fluxo sanguíneo renal gerada pela vasopressina é significativamente maior 48 horas quando comparado ao grupo controle após a indução da sepse pelo modelo de CLP. A análise dos níveis plasmáticos de vasopressina circulante durante a sepse mostrou-se elevada somente na 6ª hora após a CLP. Já a reatividade de anéis de aorta mostrou-se significativamente menor

em todos os grupos CLP, comparado ao controle. O rim isolado e perfundido obtido de animais dos grupos CLP apresentaram-se hiper-reativos à vasopressina, mas não à fenilefrina e nem à noradrenalina. Essa resposta aumentada e sustentada parece ser uma característica das fases intermediária e tardia da sepse. A avaliação, *in vitro* e por imunoeletroforese, da atividade de V1aR e das vias intracelulares que regulam o mecanismo contrátil induzido pela AVP revelaram a participação dos canais de cálcio de membrana no aumento da reatividade 18 horas após a CLP, e o aumento da atividade de proteínas da via Rho-A/ROCK na fase tardia (48 h) da sepse. Em resumo, nossos resultados mostram a particularidade do leito vascular renal frente à administração de substâncias vasoativas, em especial à vasopressina, e o envolvimento da via de sensibilização do cálcio, Rho-A/Rho-quinase no aumento da reatividade à AVP no estágio tardio da sepse.

**Palavras-chave:** CLP; vasopressina; sepse; rim; V1aR; Rho-A/Rho-quinase; cálcio; rim isolado e perfundido.

## Abstract

The administration of low doses of vasopressin (AVP) in association with norepinephrine has been recommended for some septic patients. Vasopressin has a potent vasoconstrictor effect and high amounts of this drug can cause widespread constriction and low tissue perfusion, worsening sepsis-induced organ failure. It has been demonstrated the Rho-A/Rho-kinase pathway plays a role in the effects of some vasoconstrictors, including vasopressin, phenylephrine and norepinephrine. However, it remains unknown whether the Rho-A/Rho-kinase pathway is involved in the changes of vascular reactivity to AVP described during septic shock. Using the cecal ligation and puncture (CLP) model of sepsis, we evaluated the systemic and renal vascular reactivity to AVP. We also evaluated the role of the classical calcium pathway activated by G protein coupled receptor, and the Rho-A/Rho-kinase pathway in the changes of the renal vascular reactivity to AVP. The animals subjected to CLP showed hypotension, tachycardia, hyperthermia followed by hypothermia, impaired blood cell counts and increased serum levels of nitrite (an indicative of nitric oxide production) in the first hours (3 to 6 h) after CLP, and disrupted renal function, with reduced diuresis and impaired excretion of electrolytes and urinary metabolic. The rats were allocated into four experimental groups: control; CLP 6 h; CLP 18 h; and CLP 48 h. The effects of AVP on systemic blood pressure were reduced in initial phases of sepsis, returning to normal values between 18 and 48 h after the CLP. The assessment of the renal blood flow showed that the reduction in the renal blood flow was significantly enhanced at 48 hours after CLP, compared with the control group. The plasma levels of vasopressin were increased only six hours after the CLP surgery. The reactivity of aortic rings to AVP was significantly lower in all CLP groups. The kidneys from the CLP 18 and 48 h groups were hyperreactive to vasopressin, but not to phenylephrine or norepinephrine. There were no changes in the expression of V1a

receptors in the kidneys from CLP-subjected rats. However, the expression and activity of the Rho-A/ROCK pathway were increased in the CLP 48 h group, compared with control samples. Our study reveals that the renal vascular reactivity to vasopressin varies accordingly with the time point of sepsis, and that at least in late stages of sepsis the enhanced vascular effects of vasopressin in kidneys involves an augmented activation of the Rho-A/Rho-kinase pathway. Taken together, our results show the particularity of the renal vascular bed following administration of vasoactive substances, in special to vasopressin, and the involvement of calcium sensitization pathway, Rho-A/Rho-kinase, in the increased reactivity to AVP found in late stage of sepsis.

**Key Words:** CLP; vasopressin; sepsis; kidney; V1aR; Rho-A/Rho-kinase pathway; calcium; isolated perfused kidney.



## Lista de Abreviações

a.C.	Antes de Cristo
ACH	Acetilcolina (do inglês <i>Acetylcholine</i> )
ADH	Hormônio anti-diurético (do inglês <i>Antidiuretic hormone</i> )
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina (do inglês <i>Cyclic adenosine monophosphate</i> )
AVP	Arginina vasopressina
BCA	Ácido bicinchonínico 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolína
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês <i>Bovine serum albumin</i> )
CLP	Ligadura e perfuração do ceco (do inglês <i>Cecal ligation and puncture</i> )
DAG	Diacilglicerol
FC	Frequência cardíaca
FE	Fenilefrina
FRA	Falência renal aguda
GAP	Proteínas ativadoras de GTPases (do inglês <i>GTPase activating proteins</i> )
GDI	Inibidoras de dissociação do GDP (do inglês <i>Guanine nucleotide dissociation inhibitors</i> )
GDP	Difosfato de guanosina (do inglês <i>Guanosine diphosphate</i> )
GEF	Fator de troca do nucleotídeo guanina (do inglês <i>Guanine nucleotide exchange factors</i> )
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina (do inglês <i>Cyclic guanosine monophosphate</i> )
GPCR	Receptor acoplado à proteína G (do inglês <i>G protein-coupled receptor</i> )
GTP	Trifosfato de guanosina
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
IRA	Insuficiência renal aguda

i.v.	Intravenoso
IL-10	Interleucina 10
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
INF $\gamma$	Interferon $\gamma$
IP3	Trifosfato de inositol (do inglês <i>Inositol trisphosphate</i> )
KCl	Solução salina fisiológica rica em cloreto de potássio
LPS	Lipopolissacarídeo
MLC	Cadeia leve de miosina (do inglês <i>Myosin light chain</i> )
MLCK	Quinase de cadeia leve de miosina (do inglês <i>Myosin light chain kinase</i> )
MLCP	Fosfatase de cadeia leve de miosina (do inglês <i>Myosin light chain phosphatase</i> )
mm Hg	Milímetros de mercúrio
MYPT-1	Unidade regulatória da fosfatase de cadeia leve de miosina (do inglês <i>Myosin-phosphatase target unit</i> )
NADPH	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio
NF $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B (do inglês <i>Factor nuclear kappa B</i> )
NLR	Receptor do tipo NOD (do inglês <i>NOD-like receptor</i> )
NO	Óxido nítrico (do inglês <i>Nitric oxide</i> )
NOR	Noradrenalina
NOS	Sintase de óxido nítrico (do inglês <i>Nitric oxide synthase</i> )
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PAMP	Padrão de reconhecimento associado à patógenos (do inglês <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> )

PBS	Salina tamponada com fosfato (do inglês <i>Phosphate buffered saline</i> )
PLC $\beta$	Fosfolipase C $\beta$ (do inglês <i>Phospholipase C<math>\beta</math></i> )
PPVR	Pressão de perfusão vascular renal
PRR	Receptores de reconhecimento de padrão (do inglês <i>Pattern recognition receptors</i> )
PSS	Krebs (do inglês <i>Physiological saline solution</i> )
RBD	Domínio de ligação da Rho (do inglês <i>Rho-binding domain</i> )
RPM	Rotações por minuto
SERCA	Bomba de cálcio do retículo endoplasmático (do inglês <i>Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase</i> )
SEM	Erro padrão da média (do inglês <i>Standard error of the mean</i> )
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (do inglês <i>Systemic inflammatory response syndrome</i> )
SNC	Sistema nervoso central
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TBS-T	Mistura de salina tamponada com Tris e detergente Tween 20 (do inglês <i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i> )
TLR	Receptores do tipo toll (do inglês <i>Toll like receptors</i> )
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$ (do inglês <i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )



## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Participação de vias celulares na instabilidade macro e micro vascular na falência orgânica promovida pela sepse.....	36
<b>Figura 2:</b> Ilustração da cascata de ativação da vasopressina através dos receptores V1a pela via da fosfolipase C $\beta$ e pela via de sensibilização ao cálcio, Rho-A/Rho-quinase.....	46
<b>Figura 3:</b> Ilustração esquemática do modelo experimental de sepse por ligadura e perfuração do ceco.....	59
<b>Figura 4:</b> Esquema temporal das aferições de pressão arterial e frequência cardíaca por pletismografia de cauda em animais naive, falso operados e CLP.....	62
<b>Figura 5:</b> Registro típico do teste da viabilidade tecidual e avaliação de endotélio funcional em anéis de aorta isolada de animal naive.....	69
<b>Figura 6:</b> Esquema representativo dos protocolos experimentais em rim isolado e perfundido.....	70
<b>Figura 7:</b> Avaliação da taxa de sobrevivência, da massa e da temperatura corporal na progressão do quadro séptico.....	76
<b>Figura 8:</b> Redução da pressão arterial sistólica e aumento da frequência cardíaca induzidos pela CLP.....	77
<b>Figura 9:</b> Acidez urinária acompanhada de redução de diurese em animais submetidos à CLP.....	78
<b>Figura 10:</b> Redução da excreção de sódio, potássio e ureia na urina de animais sépticos.....	79
<b>Figura 11:</b> Pressão arterial média e frequência cardíaca basais em animais anestesiados e submetidos à CLP.....	84

<b>Figura 12:</b> Manutenção do fluxo sanguíneo cortical renal basal em animais CLP quando comparados ao grupo controle.....	85
<b>Figura 13:</b> Redução da refratariedade induzida pela fenilefrina em animais sépticos.....	86
<b>Figura 14:</b> Registros típicos dos experimentos realizados para avaliar a resposta pressórica da vasopressina e noradrenalina em ratos controle ou submetidos à CLP.....	87
<b>Figura 15:</b> Alteração na responsividade à vasopressina na pressão arterial e no fluxo sanguíneo renal de ratos sépticos.....	89
<b>Figura 16:</b> Alteração na responsividade à noradrenalina na pressão arterial e no fluxo sanguíneo renal de ratos sépticos.....	90
<b>Figura 17:</b> Aumento da vasopressina plasmática 6 horas após a indução de sepse por CLP.....	91
<b>Figura 18:</b> Redução da resposta contrátil à fenilefrina e à vasopressina, mas não da resposta relaxante à acetilcolina, em anéis de aorta de animais CLP.....	95
<b>Figura 19:</b> Redução da pressão de perfusão vascular renal basal nos animais CLP 6 horas, mas não nos grupos CLP 18 e 48 horas.....	96
<b>Figura 20:</b> Alterações na reatividade vascular renal em resposta à vasopressina e à noradrenalina em preparações obtidas de animais controle ou submetidos à CLP.....	98
<b>Figura 21:</b> Registros típicos dos experimentos que avaliaram o efeito da perfusão contínua de vasopressina, noradrenalina e fenilefrina e o efeito da curva dose-resposta para acetilcolina em rins de ratos controle.....	99
<b>Figura 22:</b> Aumento da pressão de perfusão vascular renal à vasopressina em animais CLP 48 horas.....	101
<b>Figura 23:</b> Redução no aumento da pressão de perfusão vascular renal induzida pela fenilefrina e aumento da resposta frente à acetilcolina em animais CLP 18 horas....	102

<b>Figura 24:</b> Redução no efeito vasoconstritor da vasopressina na pressão de perfusão vascular renal em rins obtidos de animais controle e CLP (6, 18 e 48 horas) após perfusão com um antagonista de receptor V1a.....	104
<b>Figura 25:</b> Expressão e representação de imuno eletroforese do receptor V1a em córtex renal obtidos de ratos controle ou de animais submetidos à CLP 6 e 48 horas.....	105
<b>Figura 26:</b> Registro típico dado experimento que avaliou a participação do cálcio intracelular na resposta contrátil da vasopressina em rim isolado e perfundido.....	106
<b>Figura 27:</b> Envolvimento da via do cálcio no aumento da reatividade à vasopressina no grupo CLP 48 horas mas não 18 horas após indução de seps.....	108
<b>Figura 28:</b> Manutenção da reatividade à fenilefrina na presença e na ausência do cálcio.....	109
<b>Figura 29:</b> Expressões e respectivas representações de imuno eletroforese da bomba de cálcio Serca 2 e do receptor de IP3 em córtex renal obtidos de ratos controle ou de animais submetidos à CLP.....	110
<b>Figura 30:</b> Redução da reatividade à vasopressina induzida pela inibição da enzima Rho-quinase em leito vascular renal obtidos de animais do grupo CLP 18 horas.....	112
<b>Figura 31:</b> Redução da reatividade à vasopressina, expressa em área sob a curva, induzida pela inibição da enzima Rho-quinase em leito vascular renal obtidos de animais do grupo controle e grupos CLP.....	113
<b>Figura 32:</b> Expressões e representações de imuno eletroforese da proteína Rho-A e seu alvo ROCK (I e II) em córtex renal obtidos de ratos controle ou submetidos à CLP.....	114
<b>Figura 33:</b> Expressões e respectivas representações de imuno eletroforese da proteína MYPT-1 fosforilada (resíduo Thr 696) e da MYPT1 total em córtex renal	

obtidos de ratos controle ou de animais submetidos à CLP.....	116
<b>Figura 34:</b> Representação esquemática do aumento da atividade e expressão das proteínas da via da Rho-A/Rho-quinase no aumento da reatividade vascular renal à vasopressina exógena no estágio tardio da sepse.....	137



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Definições e sinais clínicos do quadro evolutivo da SIRS e da sepse.....	33
<b>Tabela 2:</b> Recomendações de fármacos na terapia vasopressora utilizada na sepse.....	39
<b>Tabela 3:</b> Localização e respectivas funções dos receptores de vasopressina em sistemas orgânicos.....	43
<b>Tabela 4:</b> Análise de hemograma e dosagem plasmática de nitrito em animais do grupo controle e nos tempos 6, 48 e 72 horas após indução de sepse.....	81
<b>Tabela 5:</b> Avaliação dos níveis de creatinina, ureia e lactato no plasma de animais do grupo controle e dos grupos CLP (6, 18 e 48 horas).....	92
<b>Tabela 6:</b> Resposta contrátil induzida por KCl e fenilefrina em anéis de aorta obtidos de animais controle e CLP.....	93



## Sumário

<b>1. Introdução.....</b>	<b>31</b>
1.1 Sepse, Sepse Grave e Choque Séptico.....	31
1.2 Arginina-Vasopressina.....	40
1.3 Via Rho-A/Rho-quinase.....	45
1.4 Sistema Renal na Sepse.....	48
1.5 Contextualização do Problema.....	50
<b>2. Hipótese.....</b>	<b>53</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>55</b>
3.1 Objetivo Geral.....	55
3.2 Objetivos Específicos.....	55
<b>4. Material e Métodos.....</b>	<b>57</b>
4.1 Animais.....	57
4.2 Drogas e Reagentes.....	57
4.3 Modelo Experimental: Ligadura e Perfuração do Ceco.....	58
4.4 Grupos Experimentais.....	60
4.4.1 Padronização da Curva de Sobrevida dos Animais Submetidos à CLP.....	60
4.4.2 Avaliação da Pressão Arterial Sistólica e Frequência Cardíaca por Pletismografia de Cauda.....	60
4.4.3 Avaliação da Diurese e Análise de Parâmetros Urinários.....	62
4.4.4 Avaliação de Hemograma.....	63
4.4.5 Dosagem Nitrito/Nitrato.....	63
4.5 Pressão Arterial e Fluxo Sanguíneo Renal ( <i>in vivo</i> ).....	64
4.5.1 Procedimento Cirúrgico.....	64
4.5.2 Efeito da Administração de Fenilefrina, Vasopressina e Noradrenalina na Pressão Arterial e no Fluxo Sanguíneo Renal, <i>in vivo</i> , de Ratos Naive e CLP.....	65
4.6 Dosagem da Vasopressina Plasmática.....	66
4.7 Preparações Isoladas: Rim e Aorta ( <i>in vitro</i> ).....	66
4.7.1 Procedimento Cirúrgico.....	66

4.7.2 Avaliação da Reatividade Vascular à Vasopressina, Fenilefrina e Acetilcolina em Anéis de Aorta Isolados de Ratos Naive e CLP.....	68
4.7.3 Avaliação da Resposta Contrátil à Vasopressina, Noradrenalina e Fenilefrina no Leito Vascular Renal Obtido de Animais Naive e CLP.....	69
4.7.4 Avaliação da Resposta Vasodilatadora à Acetilcolina na Pressão de Perfusão Vascular Renal <i>in vitro</i> em Animais Naive e CLP.....	70
4.7.5 Avaliação da Resposta Constrictora à Vasopressina e à Fenilefrina na Ausência de Cálcio Extracelular.....	71
4.7.6 Avaliação da Contratilidade à Vasopressina na Presença do Inibidor da Rho-quinase no Rim Isolado e Perfundido de Ratos Naive e CLP.....	71
4.7.7 Avaliação do Papel do Receptor V1a no Aumento da Pressão de Perfusão Renal Induzida pela Vasopressina em Animais Naive e CLP.....	72
4.8 Western Blot.....	72
4.8.1 Preparo da Amostra.....	72
4.8.2 Técnica e Análise de Dados.....	74
4.9 Análise Estatística.....	74
<b>5. Resultados.....</b>	<b>75</b>
<b>5.1 Parte 1: Caracterização da Sepse Induzida pelo Modelo de Ligadura e Perfuração do Ceco.....</b>	<b>75</b>
5.1.1 Alterações Indicativas de um Estado do Tipo Séptico e no Sistema Cardiovascular Induzidas por CLP...	75
5.1.2 Alterações da Função Renal após a CLP.....	78
5.1.3 Alterações Hematológicas Induzidas pela Sepse...	80
<b>5.2 Parte 2: Avaliação da Reatividade à Vasopressina Durante a Progressão do Choque Séptico.....</b>	<b>82</b>
5.2.1 Manutenção da Pressão Arterial Média, Frequência Cardíaca e Fluxo Sanguíneo Renal e Redução da Reatividade Sistêmica à Fenilefrina em Animais Submetidos ao Modelo de Sepse.....	83

5.2.2 Elevação da Pressão Arterial Sistêmica e Redução do Fluxo Sanguíneo Renal Induzidos Pela Vasopressina e Noradrenalina em Animais CLP.....	87
5.2.3 Aumento da Vasopressina Plasmática e Manutenção nos Níveis de Creatinina, Ureia e Lactato Plasmáticos nos Animais CLP Quando Comparados aos Controle.....	91
5.2.4 Avaliação, <i>in vitro</i> , da Reatividade à Vasopressina, à Fenilefrina e à Acetilcolina em Anéis de Aorta de Animais Controle e Submetidos à CLP.....	93
5.2.5 Avaliação, <i>in vitro</i> , da Pressão de Perfusão Vascular Basal de Rins Obtidos de Animais Controle ou Submetidos à CLP.....	96
5.2.6 Avaliação, <i>in vitro</i> , da Reatividade Vascular Renal à Vasopressina, Noradrenalina, Fenilefrina e Acetilcolina em Preparações Obtidas de Animais Controle e CLP.....	97
<b>5.3 Parte 3: Investigação dos Mecanismos Intracelulares Envolvidos na Manutenção e no Aumento da Reatividade Vascular Renal à Vasopressina em Animais CLP.....</b>	<b>103</b>
5.3.1 Aumento da Reatividade à Vasopressina Não é Mediado Por Alteração na Funcionalidade e na Densidade de Receptores em Rins Isolados de Animais Sépticos.....	103
5.3.2 Redução na Mobilização de Cálcio Intracelular Pela Vasopressina em Animais CLP 48 Horas.....	105
5.3.3 Participação da via Rho-A/Rho-quinase no Aumento da Reatividade à Vasopressina em Animais CLP.....	111
<b>6. Discussão.....</b>	<b>117</b>
<b>7. Conclusão.....</b>	<b>135</b>
<b>8. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>138</b>



## 1. Introdução

Hipócrates, no início do século V a.C., propôs que as doenças que acometiam os seres humanos não eram decorrentes de causas sobrenaturais, como se propagava até então. Ele acreditava que as doenças tinham causas naturais e ainda propôs que a observação detalhada destas patologias poderia prever episódios futuros e ainda direcionar para possíveis tratamentos. No entanto, as bactérias só foram identificadas em 1683 por Anton van Leeuwenhoek e, a ideia de que estes microrganismos pudessem estar associados às doenças infecciosas foi proposta em 1840 por Friedrich Gustave Jacob Henle e sustentada por Louis Pasteur em 1866 (para mais detalhes ver DA SILVA & VELASCO 2007).

Apesar dos avanços nos estudos em microbiologia e das doenças infecciosas serem descritas há mais de 5000 anos, ainda hoje novas doenças vêm sendo descobertas e associadas à presença de microrganismos, muitas delas sem perspectivas de cura ou ainda de um tratamento eficaz. Dentre elas, daremos ênfase à sepse.

### *1.1 Sepse, sepse grave e choque séptico*

Quando Schottmueller sugeriu que a liberação de agentes patogênicos na corrente sanguínea era responsável pela presença de sinais e sintomas sistêmicos (SCHOTTMUELLER, 1914 apud VINCENT, 2008), centenas de pesquisadores associaram esta definição aos quadros de infecção generalizada presente em diversos leitos hospitalares. Até o fim do século XX houve um aumento significativo no número de publicações contendo termos generalistas sobre sepse e seu agravamento. Contudo, somente em 1991 Roger C. Bone e alguns colaboradores se reuniram no

que ficou conhecido como Conferência de Consenso na tentativa de definir termos e propor algumas soluções para melhorar o diagnóstico desta patologia. Segundo essa conferência, o termo sepse foi definido como uma resposta deletéria sistêmica do hospedeiro frente a um processo infeccioso; seu agravamento pode levar ao desenvolvimento de hipoperfusão tecidual e consequente disfunção orgânica (sepse grave); e ainda à hipotensão frente a reposição volêmica com fluidos adequados ou após o tratamento com catecolaminas (choque séptico) (BONE *et al.*, 1992). Esta primeira publicação relacionada à conferência deixou como legado a necessidade de reuniões constantes na tentativa de melhorar o diagnóstico de pacientes acometidos pela sepse, além de propor soluções quanto ao uso de fluidos de reposição volêmica e outras terapias farmacológicas para esta patologia e sua progressão, preconizando a sobrevivência dos pacientes (DELLINGER *et al.*, 2004; DELLINGER *et al.*, 2008; DELLINGER *et al.*, 2013). A tabela a seguir, modificada de Dellinger *et al.* (2004), traz as definições sobre o quadro evolutivo da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS, do inglês *Systemic Inflammatory Response Syndrome*), termo também proposto na Conferência de Consenso de 1991, e da sepse, além dos sinais clínicos presentes em cada fase (Tabela 1).



**Tabela 1: Definições e sinais clínicos do quadro evolutivo da sepse.**

---

**Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS)**

- Temperatura > 38 °C ou < 36 °C
  - Frequência cardíaca > 90 batimentos por minuto
  - Frequência respiratória > 20 respirações por minuto
  - Contagem de leucócitos > 12000/mm<sup>3</sup> ou < 4000/mm<sup>3</sup>
- 

**Sepse**

Infecção acompanhada de SIRS (cultura positiva)

Em caso de cultura negativa:

- Edema significativo ou balanço de fluido positivo (20 ml/kg após 20 horas)
  - Hiperglicemia em ausência de diabetes (glicose plasmática > 120 mg/dl)
  - Marcadores inflamatórios: procalcitonina ou proteína C reativa, ambos > 2 desvios padrões além dos valores normais.
  - Saturação venosa de O<sub>2</sub> (SVO<sub>2</sub>) > 70%
  - Índice cardíaco > 3,5 L/min/M<sup>2.3</sup>
- 

**Sepse Severa**

Sepse associada a disfunção de órgãos, hipoperfusão e hipotensão

- Hipóxia arterial
  - Oligúria aguda (débito urinário < 0,5 mL/kg/h)
  - Creatinina > 2 mg/dL
  - Coagulação anormal (tempo de ativação parcial de tromboplastina > 1 minuto)
  - Trombocitopenia (contagem de plaquetas < 100000)
  - Hiperbilirrubinemia (bilirrubina plasmática total > 2 mg/dL)
  - Hiperlactatemia (lactato > 2 mmol/L)
  - Hipotensão arterial (pressão sistólica < 90 mm Hg, pressão arterial média < 70 mm Hg)
- 

**Choque Séptico**

Hipotensão induzida pela sepse apesar de terapia com fluido acompanhada de hipoperfusão tecidual e suas complicações.

---

Fonte: Modificado de Dellinger *et al.*, (2004).

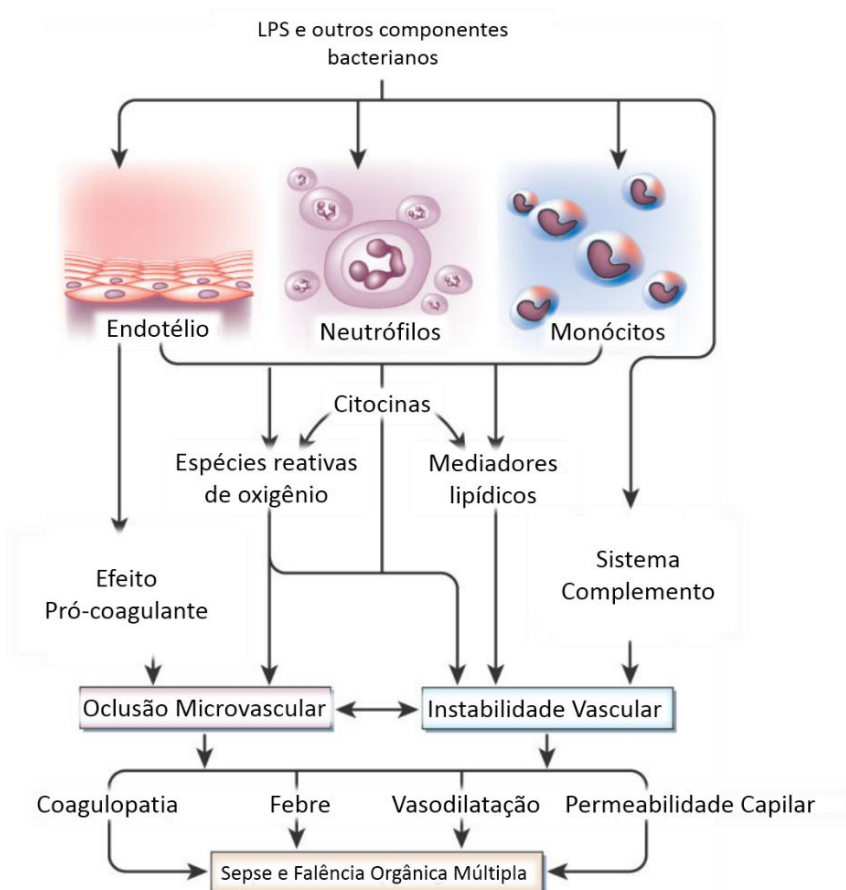
A sepse é um dos grandes problemas de saúde no mundo. Em 2001, nos Estados Unidos da América, houve um gasto de aproximadamente 22 mil dólares por paciente acometido com sepse (ANGUS *et al.*, 2001). O levantamento epidemiológico realizado em hospitais não federais dos EUA avaliados entre 1979 e 2000 estimou um aumento exponencial na taxa de pacientes diagnosticados com sepse, sendo aproximadamente 165 mil casos em 1979 e 660 mil no ano 2000, causando um aumento de 13,7% ao ano na taxa de novos casos de sepse. Contudo, neste mesmo período de análise, a taxa de mortalidade dos pacientes acometidos por este quadro infeccioso sofreu uma redução em torno de 10% (MARTIN *et al.*, 2003). No Brasil, os dados são ainda mais pessimistas, além de poucos levantamentos bibliográficos disponíveis para análise. Um estudo publicado em 2006, no qual 81 Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) foram avaliadas revelou que de cada 100 pacientes 20, 30 e 51 desenvolveram sepse, sepse grave e choque séptico, respectivamente, sendo a mortalidade destes mesmos pacientes de 16,7%, 34,4% e 65,3%, respectivamente de acordo com o agravamento da sepse (SALES *et al.*, 2006). Estudos mais recentes, como o de Kauss *et al.* (2010), mantem os padrões de incidência e mortalidade ao longo dos anos em países em desenvolvimento, como o Brasil.

O mecanismo fisiopatológico é amplamente conhecido e discutido do ponto de vista científico. Porém o que determina o resultado final desta patologia é a resposta do hospedeiro, sendo esta uma das maiores dificuldades no prognóstico otimista dos pacientes. A interação entre patógeno e hospedeiro ocorre através dos Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMP's do inglês, *Pathogen-associated Molecular Patterns*), que são componentes da parede mais externa dos agentes infecciosos, e os Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRR's do inglês, *Pattern Recognition Receptors*), presentes na superfície das membranas e em endossomos das células do sistema imune inato como os monócitos/macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células de epitélio mucoso e células endoteliais (ROBERTSON &

COOPERSMITH, 2006). Dentre estes receptores de reconhecimento de PAMP's, os do tipo Toll (TLR, do inglês *Toll-Like Receptors*) são os principais, estando presentes na superfície das células ou em seu interior. Outras proteínas como CD14 e receptores do tipo NOD (NLR do inglês, *NOD-Like Receptor*) também possuem papel fundamental no reconhecimento de patógenos.

Este reconhecimento e ativação das células imunológicas gera uma cascata de sinalização intracelular que ativa fatores de transcrição responsáveis pela expressão e liberação de fatores pró-inflamatórios. Dentre as principais moléculas liberadas na fase inicial da resposta inflamatória encontram-se o fator de necrose tumoral do tipo  $\alpha$  (TNF $\alpha$  do inglês, *Tumor Necrosis Factor-alpha*), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), fator de ativação plaquetária, óxido nítrico (NO do inglês, *Nitric Oxide*), entre outros. Simultaneamente, o hospedeiro também responde à infecção com produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e Interferon  $\gamma$ . Estas têm papel fundamental em contrabalancear as ações dos agentes pró-inflamatórios, inibindo sua síntese, sua liberação ou ainda antagonizando seus efeitos (DINARELLO, 1997).

A Figura 1, adaptada do artigo publicado por Jonathan Cohen (2002), mostra as cascatas ativadas a partir do reconhecimento do patógeno (bacteriano ou outros microrganismos) pelas células do sistema imunológico, que irão levar à instabilidade micro e macrovascular, culminando nas características já conhecidas da sepse e de seu agravamento.



**Figura 1: Participação de vias celulares na instabilidade macro e micro vascular na falência orgânica promovida pela sepse.** A ativação de células do sistema imune e endoteliais, por moléculas componentes das bactérias ou ainda de outras fontes patogênicas, aumenta a produção de citocinas e moléculas efetoras como substâncias pró-coagulantes e espécies reativas de oxigênio que levam ao aumento da instabilidade macro e microvascular, gerando para a febre, a vasodilatação sistêmica, as coagulopatias e o aumento da permeabilidade vascular. Esses, por sua vez, contribuem de forma direta para a falência orgânica múltipla presente na sepse grave (Fonte: Adaptado de Cohen, 2002).

O NO foi por muitos anos, e ainda é, visto como o maior responsável pela disfunção vascular e consequente hipotensão observados durante o choque séptico. O NO é sintetizado a partir da L-arginina por ação de três isoformas de óxido nítrico sintase (NOS do inglês, *Nitric Oxide Synthase*), sendo duas do tipo constitutiva (NOS I e NOS III) e uma do tipo induzida (NOS II) (para revisão ver LUNDBERG, GLADWIN e WEITZBERG, 2015). Durante a sepse, a NOS II é a responsável pela produção exacerbada de NO observada nas diferentes fases da doença e tem um papel fundamental no combate ao agente patogênico, sendo ativada diretamente pelo patógeno ou ainda por citocinas liberadas durante a sepse. Contudo, essa grande produção também é responsável pela hipotensão arterial sistêmica e, em parte, pela resistência aos agentes vasoativos observada em modelos experimentais de endotoxemia e em pacientes com sepse (para revisão FERNANDES & ASSREUY, 2008). Porém, estudos realizados no início da década de 90 demonstraram que animais endotoxêmicos tratados com diferentes doses de L-NMMA (NG-monometil-L-arginina, um inibidor não seletivo da NOS) apresentam resultados contraditórios, podendo levar à melhora no quadro de hipotensão ou ainda danificar mais a função cardíaca e aumentar as taxas de mortalidade observadas nestes estudos (WRIGHT, REES & MONCADA, 1992). Resultados similares foram observados em pacientes por Petros, Bennett e Vallance (1991), mostrando que a retirada do NO dos organismos sépticos não parece ser ideal, ou ainda, o único mecanismo para a recuperação da responsividade às catecolaminas em pacientes sépticos.

A terapia atual utilizada durante a sepse pode ser dividida em farmacológica e não-farmacológica, ambas preconizando a manutenção da pressão arterial média e consequente perfusão tecidual adequada. Segundo a última atualização das Diretrizes Internacionais para Gerenciamento da Sepse Grave e do Choque Séptico (*Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock*), publicada no

início de 2013, a terapia adequada nas seis primeiras horas pós início da resposta inflamatória sistêmica frente a um agente infeccioso pode reduzir em até 16% a taxa de mortalidade dos pacientes acometidos. Isso porque a sepse possui duas fases distintas quanto à sua dinâmica cardiovascular. A fase inicial é denominada hiperdinâmica e tem como características o aumento do débito cardíaco e a baixa resistência vascular periférica. Já a fase tardia, também conhecida como hipodinâmica, é caracterizada pela redução do trabalho cardíaco associada à hipotensão severa e consequente baixa perfusão tecidual (FLYNN, CHOKKALINGAM & MATHER, 2010). Desta maneira, a terapia com vasopressores é sempre utilizada quando a tentativa de reposição volêmica não é suficiente para minimizar a hipotensão sistêmica. Dentre as substâncias utilizadas encontram-se a noradrenalina, a adrenalina, a vasopressina, a dopamina e a fenilefrina, sendo estes fármacos utilizados de maneira isolada ou em associações uns com os outros.

A Tabela 2 mostra os fármacos vasopressores mais utilizados e por quais motivos são requeridos, além da recomendação de acordo com o grau de evidência clínica. De acordo com os critérios de classificação GRADE (do inglês *Grades of Recommendation, Assessment, Development and Evaluation*) as letras indicam a qualidade das evidências sobre aquele determinado fármaco sendo (A) alto grau de evidência, (B) grau de evidência moderado, (C) baixo grau de evidência e (D) grau de evidência muito baixo. Já os números são utilizados quanto à recomendação do fármaco, sendo (1) forte recomendação e (2) fraca recomendação (DELLINGER *et al.* 2008; DELLINGER *et al.* 2013). O termo UG (do inglês *Ungraded*), descrito nos itens relacionados à vasopressina significam que os trabalhos existentes são pouco ou nada conclusivos, não possuindo classificação.

**Tabela 2: Recomendações de fármacos na terapia vasopressora utilizada na sepse.**

<b>Recomendações da terapia vasopressora</b>	<b>Critérios GRADE</b>
A terapia vasopressora é utilizada na tentativa de manter a pressão arterial média acima de 65 mm Hg.	1C
Noradrenalina é o vasopressor de primeira escolha.	1B
Adrenalina é utilizada como um fármaco adicional à noradrenalina para manter a pressão arterial adequada.	2B
Vasopressina (0,03 unidades/minuto) pode ser associada à noradrenalina para elevar a pressão arterial ou reduzir a dose de noradrenalina utilizada.	UG
Pequenas doses de vasopressina não são recomendadas como vasopressor único para o tratamento da hipotensão induzida pela sepse. Altas doses de vasopressina devem ser reservadas para a terapia de resgate, isto é, quando outros fármacos falham na manutenção da pressão arterial média.	UG
Dopamina deve ser usada como um agente vasopressor alternativo à noradrenalina em pacientes com baixo risco de arritmias e bradicardia.	2C
Fenilefrina não é recomendada no tratamento do choque séptico exceto nas seguintes circunstâncias: (i) noradrenalina for associada à arritmia, (ii) paciente com débito cardíaco elevado e pressão arterial baixa e (iii) como terapia de resgate (quando a combinação de agentes vasopressores ou baixas doses de vasopressina falham no alcance da pressão arterial adequada).	1C

(Fonte: Modificado de Dellinger *et al*, 2013).

## *1.2 Arginina-vasopressina*

Um hormônio importante liberado em grande quantidade nos estágios iniciais da sepse é a arginina-vasopressina. Os primeiros indicativos de que a vasopressina poderia estar envolvida na tentativa de manutenção da homeostase do sistema cardiovascular na sepse ocorreram no início da década de oitenta. Utilizando ratos da linhagem Sprague-Dawley (controle) e Brattleboro (linhagem homozigota que não produz vasopressina endogenamente), Breckett e colaboradores demonstraram que a vasopressina endógena produzida na fase inicial do choque endotoxêmico contribui para a sobrevivência e controle da pressão arterial dos animais submetidos ao modelo de endotoxemia (BRACKETT, SCHAEFER & WILSON, 1983). Desde então diversos estudos têm demonstrado que este agente vasoconstritor pode ter um papel fundamental não só na fisiologia cardiovascular, mas também em algumas doenças que afetam a homeostase deste sistema.

Em 1895 Oliver e Schafer avaliaram os efeitos cardiovasculares de extratos de glândulas como a pituitária e tireoide. Eles observaram que pessoas que recebiam esse extrato de pituitária por via endovenosa tinham sua pressão arterial elevada, atribuindo este aumento principalmente à contração arteriolar e aumento da frequência cardíaca. Esses experimentos deram início a diversas pesquisas que relacionavam a possível presença de agentes vasoativos produzidos ou somente armazenados na glândula pituitária. Quase 20 anos depois, em 1913, dois pesquisadores renomados, Farini e von den Velden, demonstraram que o tratamento de pacientes diabéticos através de injeções subcutâneas de extratos da neurohipófise melhorava os sintomas de sede e poliúria, atribuindo estes achados aos efeitos antidiuréticos da glândula em questão. Porém, foi somente em 1951 que Robert Turner e colaboradores isolaram e purificaram pela primeira vez o hormônio vasopressina e, em



1954, Vincent du Vigneaud a sintetizou em laboratório (para revisão histórica ver ROCHA *et al.*, 2000). Na ausência de evidências que comprovassem que ambas as substâncias eram na verdade a mesma, duas nomenclaturas foram utilizadas com base nos efeitos até então observados: vasopressina e hormônio antidiurético (REEVES *et al.*, 1985 apud WILSON *et al.*, 1998).

A vasopressina, assim como a ocitocina, é um hormônio nonapeptídico, ou seja, formado por sequências de 9 aminoácidos (Cisteína (Cys) – Tirosina (Tyr) – Fenilalanina (Phe) – Glutamato (Glu) – Aspartato (Asp) – Cisteína (Cys) – Prolina (Pro) – Arginina (Arg) – Glicina (Gly) e produzidos por neurônios magnocelulares localizados nos núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo com projeções celulares na hipófise posterior, local onde a vasopressina fica armazenada antes de sua liberação (MEYER-LINDENBERG, DOMES & KIRSH, 2012). Este ciclo de síntese e armazenamento demora cerca de duas horas. A vasopressina, uma vez na corrente sanguínea, possui tempo de meia-vida entre 10 e 35 minutos e é degradada nos rins e fígado através de peptidases. O aumento da osmolaridade plasmática, ou ainda a redução na tensão atrial por hipovolemia, ou a simples queda na pressão arterial por qualquer outro indicativo são fatores que estimulam os barorreceptores, localizados na carótida e no átrio esquerdo cardíaco, e os osmorreceptores, localizados no sistema nervoso central, a liberarem a vasopressina previamente armazenada, e ainda estimulam a produção deste hormônio em um novo ciclo. Além destes, outros estímulos hormonais e de substâncias endógenas e exógenas, como a dor, o estresse ou o uso de fármacos como os opióides podem estimular a produção e liberação da vasopressina (HOLMES *et al.*, 2001).

Até o momento, foram clonados três subtipos de receptores de vasopressina: V1a, V2 e V1b (também chamado de V3); todos da família dos receptores acoplados à proteína G (GPCR do inglês, *G protein-coupled receptor*). Os receptores do tipo V1a e V1b, expressos nos vasos sanguíneos e na hipófise

anterior, respectivamente, uma vez ativados pela vasopressina, irão acionar a cascata intracelular da fosfolipase C (receptores acoplados à proteína G do tipo q, Gq/G11), enquanto que a ativação dos receptores do tipo V2, localizados nos túbulos distais e ducto coletor renal, estimulam a via da adenilato ciclase (GPCR do tipo s, Gs) (BIRNBAUMER *et al.*, 1992; MPREL *et al.*, 1992; SUGIMOTO *et al.*, 1994). A Tabela 3 mostra os tipos de receptores de vasopressina, assim como local de expressão e principal função.

**Tabela 3: Localização e respectivas funções dos receptores de vasopressina em sistemas orgânicos.**

V1a		V1b		V2	
Localização	Função	Localização	Função	Localização	Função
Músculo Liso Vascular e Cardíaco	Vasoconstrição Hipertrofia Miocárdica	Células Corticotrópicas Pituitária Anterior	Liberação de hormônio adreno-corticotrófico	Membrana Basolateral do Ducto Coletor Renal	Reabsorção de Água (inserção de Aquaporinas-2 na Membrana Apical; além da indução da síntese de Aquaporina-2)
Plaquetas	Agregação	-----	-----	Endotélio Vascular	Liberação do Fator de von Willebrand e Fator VIII
Miométrio	Contração Uterina	-----	-----	-----	-----

(Fonte: Modificado de Finley *et al.*, 2014).

Como mencionado anteriormente, a vasopressina, uma vez ligada ao seu receptor do tipo V1a, desencadeia uma série de alterações intracelulares que irão culminar na contração das células do músculo liso vascular e consequente vasoconstrição. A ligação da vasopressina ao receptor V1a ativa uma proteína G do tipo q/11 (Gq/11), responsável pela ativação de uma classe de enzimas denominadas fosfolipases C $\beta$  (PLC $\beta$ ), que clivam fosfolípidios de membrana em inositol (1,4,5) trisfosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). As moléculas de IP3 atuam em receptores ionotrópicos específicos presentes na membrana do retículo sarcoplasmático, denominados IP3R, liberando Ca<sup>2+</sup> do mesmo e aumentando a concentração do cálcio livre no meio intracelular. Este cálcio se liga à calmodulina, formando um complexo Ca<sup>2+</sup>-calmodulina que ativa a quinase de cadeia leve de miosina (MLCK do inglês, *Myosin Light Chain Kinase*). Esta por sua vez, fosforila a cadeia leve de miosina (MLC do inglês, *Myosin Light Chain*), que leva ao aumento da afinidade dos filamentos grossos de miosina pelos de actina e promove a contração celular (HONG *et al.*, 2011). O estado vasorrelaxante ocorre após o desacoplamento do agente vasoconstritor do seu receptor específico e ativação da enzima fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP do inglês, *Myosin Light Chain Phosphatase*), enzima responsável pela retirada do grupo fosfato da cadeia leve de miosina e consequente relaxamento do vaso.

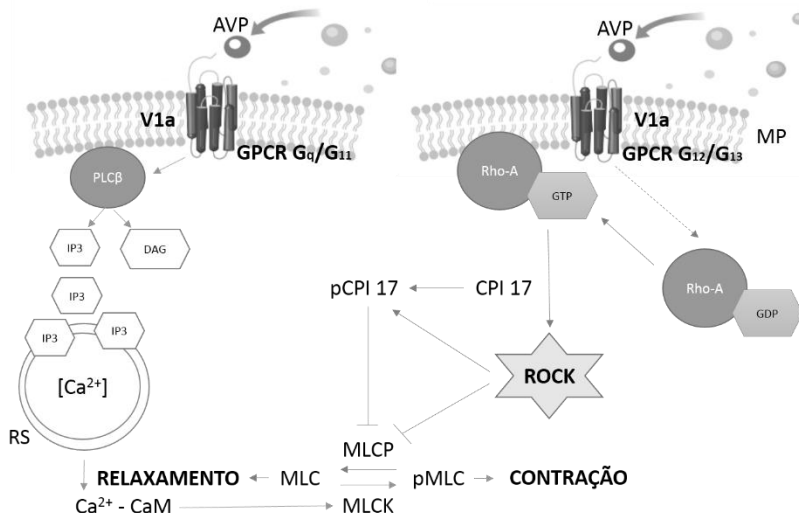
Quando comparado a outros vasoconstritores como a noradrenalina e a fenilefrina, a vasopressina é muito mais potente. Isso porque além do mecanismo de contração citado acima, este hormônio também utiliza outras cascatas contráteis para sua função na musculatura lisa vascular. Como veremos adiante, esses mecanismos podem contribuir para o embasamento de sua utilização na clínica durante o choque refratário. Porém, ainda não se sabe ao certo se essa contribuição é benéfica ou deletéria, visto que seu potencial vasoconstritor é muito acentuado.

### 1.3 Via Rho-A/Rho-quinase

As proteínas G pequenas foram descritas pela primeira vez após a descoberta dos genes codificantes da proteína Ras em sarcoma vírus no final da década de 70 (SHIN *et al.*, 1978; CHIEN *et al.*, 1979). Em 1985, o gene da proteína Rho foi descoberto em *Aplysia* como sendo um homólogo do gene Ras (MANDAULE & AXEL 1985). Atualmente mais de 100 pequenas proteínas G, uma imensa família de proteínas G monoméricas de peso molecular entre 20-40 kDa, já foram identificadas em eucariotos. Essa superfamília é dividida em: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf e Ran (HALL, 1990; BOURNE, SANDERS & MCCORMICK, 1991; TAKAI *et al.*, 2001). Como foco do nosso estudo, vamos nos aprofundar na subfamília Rho. Esta subfamília é compreendida por diversas proteínas como Rho, Rac e Cdc42 (um total de 14 membros distintos). Dentro da subfamília Rho, encontra-se a Rho-A, proteína envolvida na reorganização do citoesqueleto e, de modo mais geral, na manutenção da contração celular (HALL, 1998).

A Rho-A é uma proteína G pequena de 21 kDa que possui como molécula efetora a proteína quinase associada à Rho também conhecida como ROCK. Há duas isoformas de ROCK, I e II, sendo ambas expressas constitutivamente em diversos tecidos, como os vasos sanguíneos, rins, cérebro, leito mesentérico, pulmões, entre outros (ISHIZAKI *et al.*, 1996; LEUNG *et al.*, 1996; WIBBERLEY *et al.*, 2003). Alguns estímulos, como a ligação de agonistas aos GPCRs, a redução da perfusão tecidual ou ainda as espécies reativas de oxigênio *per se* podem desencadear a ativação da via Rho-A/Rho-quinase. Por exemplo, simultaneamente à via da proteína Gq, a ligação da vasopressina a seu GPCR leva à ativação de proteínas G heterotriméricas da família G12/13. A proteína G12/13, por sua vez, ativa uma série de fatores que irão promover a translocação da proteína Rho-A citosólica para a membrana. Uma vez ativa, a Rho-A promove a ativação do seu alvo Rho-quinase (ou ROCK, tipos I e II). Esta

atua na fosforilação da subunidade regulatória da fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP do inglês, *Myosin Light Chain Phosphatase*) denominada MYPT-1 (do inglês, *Myosin-Phosphatase Target Unit*), impedindo seu efeito sobre a contração (SOMLYO & SOMLYO, 2003; WILSON et al., 2005; KNOCK et al., 2009). Outro alvo importante das ROCKs é a proteína fosfatase do tipo 1 inibitória (CPI-17) que, quando fosforilada no sítio T-38 pela Rho-quinase, liga-se à subunidade fosfatase da MLCP, bloqueando sua função inibitória (UEHATA et al., 1997; KOYAMA et al., 2000). A Figura 2 ilustra essa ativação.



**Figura 2: Ilustração da cascata de ativação da vasopressina através dos receptores V1a pela via da fosfolipase Cβ e pela via de sensibilização ao cálcio, Rho-A/Rho-quinase.** AVP, vasopressina; V1a, receptor do tipo V1a de vasopressina; GPCR, receptor acoplado a proteína G; PLCβ, fosfolipase do tipo Cβ; IP3, trifosfato inositol; DAG, diacilglicerol; RS, retículo sarcoplasmático; CaM, calmodulina; MLC, cadeia leve de miosina; pMLC, cadeia leve de miosina fosforilada; MLCP, fosfatase de cadeia leve de miosina; MLCK, quinase de cadeia leve de miosina; MP, membrana plasmática. (Fonte: a autora).

A ativação da proteína Rho-A ocorre pela transição do estado Rho-GDP *off* para Rho-GTP *on*. Essa ativação, assim como de modo indireto toda a via Rho-A/Rho-quinase, pode ser regulada por algumas proteínas sinalizadoras: fatores de troca do nucleotídeo de guanina (GEF's do inglês, *Guanine Nucleotide Exchange Factors*), proteínas ativadoras de GTPases (GAP's do inglês, *GTPase Activating Proteins*) e inibidores da dissociação do GDP (GDI's do inglês, *GDP Dissociation Inhibitors*). De maneira simplificada, em estado de repouso, a Rho-GDP inativa está localizada no citosol e é mantida neste estado pelas GDI's. Após a ligação do agonista em seu receptor e ativação do receptor acoplado à proteína G, a proteína Rho se dissocia do GDI e transloca-se para a membrana celular, onde os fatores de troca (GEF's) promovem a troca do GDP pelo GTP. Inversamente, a Rho-GTP é neutralizada pela ativação das GAP's (para mais detalhes ver a revisão de PUETZ, LUBOMIROV & PFITZER, 2009).

A participação da via Rho-A/Rho-quinase está bem descrita não só em processos fisiológicos, como também em diversas patologias que acometem o sistema cardiovascular. Um dos primeiros estudos foi realizado por Uehata e colaboradores (1997), no qual demonstraram a participação da Rho-quinase no mecanismo exacerbado de contração do músculo liso vascular em artérias mesentéricas de coelho, em cultura de células e na pressão arterial em modelos experimentais de hipertensão. Posteriormente, diversos autores demonstraram a participação desta via na disfunção erétil (LI *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2014), aterosclerose (VAN NIEUW, VERMEER, VAN HINSBERGH, 2000; ZHOU *et al.*, 2012), falência cardíaca (HISAOKA *et al.*, 2001), diabetes (LI *et al.*, 2016) e em outras patologias que afetam não só o sistema cardiovascular, mas que interferem na homeostase do organismo como um todo.

Por ser uma via intracelular descoberta recentemente, poucos estudos pré-clínicos já demonstraram o envolvimento da

via Rho-A/Rho-quinase nas disfunções cardiovasculares induzidas pela sepse, utilizando principalmente modelos experimentais como os modelos de endotoxemia induzida por LPS e o do choque séptico induzido por ligadura e perfuração do ceco. Em um estudo pioneiro, da Silva-Santos e colaboradores (2009) mostraram haver um comprometimento na via Rho-A/Rho-quinase, mais especificamente uma redução na expressão da pMYPT1, em artérias mesentéricas de ratos tratados com LPS. Além disso, este estudo também mostrou que esta condição estava relacionada ao excesso de óxido nítrico produzido durante a endotoxemia experimental. A partir destes achados, nosso grupo tem se dedicado a investigar a participação desta via durante a progressão do choque séptico (GUARIDO *et al.*, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2014; DE SOUZA *et al.*, 2016) para melhor compreender esta patologia e buscar colaborar para o desenvolvimento de novas terapias mais eficazes do que as utilizadas atualmente.

#### 1.4 Sistema Renal e a Seps

A regulação da pressão arterial sistêmica é um processo complexo que envolve diversos mecanismos e tem o objetivo de manter a homeostase orgânica. Há aqueles de ação rápida, capazes de reagir em poucos segundos às variações pressóricas, como os barorreceptores, os quimiorreceptores e os mecanismos que atuam na percepção isquêmica do sistema nervoso central. Já a regulação a longo prazo requer um mecanismo de ajuste fino, como o sistema hormonal, capaz de estabilizar e manter a pressão arterial sistêmica em níveis normais (GUYTON, 1991).

O sistema renal, além de seu papel fundamental na filtração sanguínea, balanço eletrolítico e excreção de substâncias através da urina (para revisão NAVAR, 2005; TAAL *et al.*, 2012), tem uma função importante no controle do tônus vascular



sistêmico por meio da regulação do volume sanguíneo. Dentre estes mecanismos, há os que estimulam a liberação de substâncias diretamente no sistema nervoso central (SNC), como a vasopressina, ou ainda aqueles no qual há a produção e estimulação local de substâncias vasoativas como a renina, que de maneira direta através da angiotensina II, leva ao aumento da produção de aldosterona. Ambos são liberados em condições específicas. Por exemplo, enquanto a aldosterona é preferencialmente liberada em casos de hipovolemia e hipotensão, a vasopressina é primordialmente liberada em alterações de osmolaridade dos vasos sanguíneos.

Além de mecanismos de controle sistêmico da regulação do tônus e consequentemente da pressão arterial, o sistema renal ainda possui um mecanismo de auto-regulação interna capaz de ajustar a perfusão tecidual renal independentemente das alterações sistêmicas de pressão arterial e débito cardíaco. Este mecanismo é importante para manter o sistema renal “saudável”, pois doenças que acometem o sistema cardiovascular podem comprometer a função renal e causar um desequilíbrio na homeostase do organismo como um todo. Assim, as oscilações na pressão arterial sistêmica consideradas fisiológicas não seriam danosas ou causariam alterações na hemodinâmica renal (LOUTZENHISER *et al.*, 2006; CUPPLER & BRAAM, 2007).

Algumas patologias, e dentre elas a sepse, comprometem o aporte de oxigênio e perfusão tecidual adequada para os rins, levando a um quadro de falência renal associada à sepse. Em um estudo recente, Kumar *et al.*, (2011) relataram que, em 2007, a falência renal aguda foi a disfunção orgânica mais comum associada à sepse grave. Sabe-se que o comprometimento do sistema renal está intimamente associado ao aumento nas taxas de morbidade e de mortalidade de pacientes acometidos pela sepse. Fica evidente a necessidade de entender um pouco melhor como é o comportamento local do leito vascular renal na sepse e

se este pode colaborar para as eventuais melhorias ou danos causados ao longo do quadro séptico.

Cavarape *et al.* (2003) evidenciaram a importância da via da Rho-A/Rho-quinase no controle fisiológico do tônus vascular renal, assim como ocorre em outros leitos, frente a agentes vasoconstritores como angiotensina II, arginina-vasopressina e tromboxano AII. Em 2004, Boffa e colaboradores mostraram que após a administração de LPS, camundongos apresentam uma fase inicial de vasoconstrição renal, acompanhada da redução do fluxo sanguíneo renal e taxa de filtração glomerular (BOFFA *et al.*, 2004). Estes resultados contrastam com as características de hipotensão e vasodilatação sistêmicas que acompanham o quadro clínico de sepse e podem sugerir que o sistema renal apresenta um mecanismo independente de controle do tônus vascular durante esta patologia. Em 2005, Boffa e Arendshorst demonstraram que uma das prováveis causas da falência renal induzida pela sepse é a manutenção da reatividade vascular renal a agentes vasoconstritores (BOFFA & ARENDSHORST, 2005). Apesar da existência de muitos estudos sobre a sepse, pouco se sabe sobre a manutenção do tônus vascular renal e quais os mecanismos envolvidos nesta regulação independente nas condições desfavoráveis promovidas por esta patologia.

### *1.5 Contextualização do Problema*

A sepse continua a ser, no decorrer das últimas décadas, uma doença com altos índices de morbidade e mortalidade, apesar dos avanços clínicos em diagnóstico e terapia. O campo da pesquisa, em especial, tem se dedicado à compreensão dos aspectos fisiopatológicos, epidemiológicos e terapêuticos. Contudo, apesar dos esforços, os resultados ainda são pouco eficientes no que diz respeito à melhora dos índices hospitalares e na qualidade de vida dos pacientes que passam por esse quadro

gravíssimo. Desta maneira, faz-se necessária a busca por estratégias para que futuros pacientes acometidos pela sepse e por seus agravamentos tenham um prognóstico e um desfecho favorável quanto à sua condição.

Sendo a vasopressina uma ferramenta utilizada na refratariedade às catecolaminas durante o choque séptico, fica evidente a necessidade de compreender os mecanismos de ação pelos quais seu uso se tornou uma alternativa nesta patologia. Neste contexto, nosso trabalho busca propor indícios pré-clínicos que direcionem os trabalhos de futuros pesquisadores na busca por melhorar o prognóstico desfavorável que ainda hoje acomete pacientes sépticos no âmbito mundial. Infelizmente, a terapia atual não é capaz de dar suporte às alterações orgânicas que acometem os pacientes sépticos e é isto que impulsiona pesquisadores do mundo todo a dedicarem anos de suas pesquisas à procura do que um dia poderemos chamar de cura.



## **2. Hipótese**

Nossa hipótese é que a ativação da via Rho-A/ROCK, desencadeada pela ligação da vasopressina a seu receptor do tipo V1a, contribui para o aumento da resposta vascular renal à vasopressina, exacerbando a redução da perfusão tecidual e piora dos efeitos deletérios da falência renal aguda induzida pela sepse.



### 3. Objetivo

#### 3.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi caracterizar a resposta vasoconstritora da vasopressina ao longo da progressão da sepse induzida pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco, com ênfase no leito vascular renal, investigando a participação da via Rho-A/Rho-quinase nas alterações de resposta contrátil à AVP nesta condição experimental.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar as alterações cardiovasculares e renais (*in vivo*) ao longo da progressão da sepse decorrente do modelo de ligadura e perfuração do ceco.
- b) Avaliar o perfil da resposta cardiovascular (*in vivo* e *in vitro*) aos diferentes agentes com ação vascular (fenilefrina, noradrenalina, vasopressina e acetilcolina) durante a progressão da sepse.
- c) Investigar as ações destes mesmos fármacos, em especial da vasopressina, no leito vascular renal de animais submetidos à ligadura e perfuração do ceco.
- d) Avaliar os mecanismos intracelulares envolvidos no efeito vasoconstritor da vasopressina no leito vascular renal de ratos com sepse induzida pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco.
- e) Investigar a expressão de proteínas intracelulares da via clássica IP3-cálcio e da via Rho-A/Rho-quinase, envolvidas na reatividade vascular renal induzida pela vasopressina em animais sépticos.





## 4. Material e Métodos

### 4.1 Animais

Para a realização deste estudo foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*) Wistar, com três meses de idade e peso entre 300 a 350 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, com luminosidade e temperatura controladas (ciclo 12 horas claro/escuro;  $22 \pm 2^{\circ}$  C, respectivamente) e tiveram livre acesso a água e ração até a realização dos experimentos. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (PP00566).

### 4.2 Drogas e Reagentes

As seguintes drogas e reagentes foram utilizados neste estudo: fenilefrina, vasopressina, noradrenalina, acetilcolina e [Fenilacetil<sup>1</sup>, O-Me-D-Tir<sup>2</sup>, Arg<sup>6</sup>,8, Lis<sup>9</sup>]-Vasopressina amido (chamado de DTM-AVP), anti- $\beta$ -actina e todos os sais do preparo de Krebs e PBS (Sigma-Aldrich Co LCC, St Louis, Missouri, EUA); Y-27632 (trans-4-[(1R)-1-Aminoetil]-N-4-piridinil-ciclohexanocarboxamido dihidroclorido, Tocris Bioscience, Bristol UK); heparina sódica (Hipolabor Farmacêutica, Belo Horizonte, MG); cetamina e xilazina (Syntec do Brasil, Santana de Parnaíba, SP); cloridrato de lidocaína e cloridrato de tramadol (Cristália, Itapira, SP). Anticorpo monoclonal Rho-A, ROCK I, ROCK II e MYPT1 total (BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA); anticorpo monoclonal pMYPT1 (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA); anticorpo monoclonal IP3R e Serca 2 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA); e anticorpos

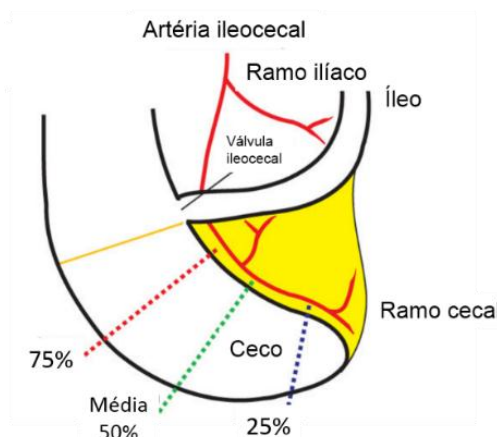
secundários *rabbit* e *mouse* (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA).

Todas as doses e concentrações dos fármacos, assim como as diluições dos anticorpos utilizados neste trabalho, tanto para os experimentos *in vitro* e *in vivo* quanto para a parte molecular deste estudo, foram escolhidas a partir de experimentos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### 4.3 Modelo Experimental: Ligadura e Perfuração do Ceco

Os animais foram divididos, de modo randomizado, em grupos controles, que em um primeiro momento foi formado por animais naïve e animais falso operados, denominados Sham, e animais submetidos à ligadura e perfuração do ceco, modelo este usado para indução de sepse conforme descrito por Wichterman *et al.* (1980). Para isso, os animais foram sedados com xilazina (5 mg/kg, i.p.) e receberam cloridrato de tramadol (10 mg/kg, i.p.) para analgesia. Após 15 minutos, os animais foram acondicionados em uma câmara para indução de anestesia pré-operatória com isoflurano (5%) e oxigênio (100%). Em seguida, os animais foram colocados em decúbito dorsal, sobre uma manta aquecida, e mantidos sob anestesia (isoflurano 2% e oxigênio 100%) através de uma máscara facial. Após tricotomia e limpeza da região abdominal com gaze e álcool 70%, foi administrado lidocaína (2% livre de agente vasoconstritor) como anestésico local na região da linha alba. Após confirmação da ausência de reações aos estímulos externos, os animais foram submetidos a uma laparotomia, de aproximadamente 2 centímetros, para localização e exposição do ceco. Foi realizada a ligadura cecal não obstrutiva (50% do ceco a contar da válvula ileocecal) com fio cirúrgico de seda tamanho 0. Quatro furos não transfixantes foram

realizados utilizando uma agulha do tamanho 18G, seguidos de um leve pressionamento para extravasamento do conteúdo fecal. A Figura 3 ilustra o procedimento cirúrgico utilizado para a indução de sepse.



**Figura 3: Ilustração esquemática do modelo experimental de sepse por ligadura e perfuração do ceco.** A sepse é induzida através de uma laparotomia e exposição do ceco (região que liga o intestino delgado ao grosso). A ligadura realizada não deve ser obstrutiva e amarra 50% da porção cecal. O ceco é então perfurado (4 vezes de modo não transfixante, conforme descrito na metodologia) para extravasamento de fezes com posterior retorno do ceco à cavidade peritoneal. (Fonte: Adaptado de Rittirsch *et al.*, 2009).

Após realocar o ceco na cavidade abdominal, foi realizada uma sutura da camada muscular (fio de nylon 3-0), seguida do clampeamento da pele com grampos metálicos (Auto Clip 9 mm Applier, MikRon Precision Inc. Marysville, Washington, Estados Unidos). Imediatamente após, os animais receberam uma única reposição volêmica (salina tamponada aquecida no volume de 30 ml/kg, s.c.). Cloridrato de tramadol (5 mg/kg, s.c.) foi administrado em intervalos de 12 horas até a 48ª hora pós-cirúrgica. Os animais

ficaram acondicionados em caixas plásticas (máximo de 5 animais por caixa) sobre um colchão térmico até total recuperação cirúrgica (tempo de aproximadamente 6 horas) e foram acomodados novamente no biotério local do laboratório com livre acesso à água e ração. Os animais denominados sham (falso operados) passaram pelo mesmo procedimento anestésico, sutura e procedimentos pós-cirúrgicos, porém sem terem o ceco amarrado e perfurado. Os animais naïve não foram submetidos a qualquer procedimento, assim como nenhum tratamento de reposição hídrica ou farmacológico pós-cirúrgico.

#### *4.4 Grupos Experimentais*

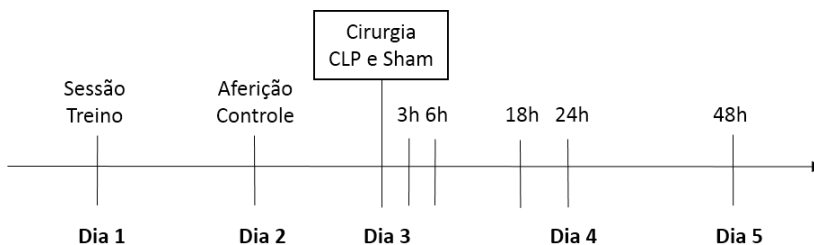
##### *4.4.1 Padronização da Curva de Sobrevida dos Animais Submetidos à CLP*

A fim de caracterizar o modelo experimental utilizado neste trabalho, realizamos os procedimentos cirúrgicos, conforme detalhado no item anterior, e avaliamos a taxa de sobrevida dos animais ao longo de 120 horas. Essa curva foi repetida 4 vezes para padronizar uma mortalidade de aproximadamente 50%, a qual foi associada a sepse de grau moderado que preconizamos.

Simultaneamente às observações de taxa de sobrevida, temperatura e massa corporal também foram avaliados ao longo das 48 horas iniciais após o procedimento cirúrgico, utilizando um termômetro retal e uma balança de precisão, respectivamente.

##### *4.4.2 Avaliação da Pressão Arterial Sistólica e Frequência Cardíaca por Pletismografia de Cauda*

Para mensurar as alterações cardíacas nas fases iniciais, intermediárias e tardias pós CLP, os animais foram avaliados antes da cirurgia (aferição controle) e nos tempos 3, 6, 18, 24 e 48 horas após a CLP. Para isso foi empregada a metodologia de pletismografia de cauda, uma técnica que utiliza um contensor de acrílico no qual o animal fica imobilizado, um manguito (*tail cuff*) que é colocado na cauda do animal, um transdutor de pressão também alocado na cauda do animal e um sistema de aquisição de dados (PowerLab, AD Instruments, Austrália). Primeiramente foi realizada uma sessão treino (Dia 1), na qual o animal teve seu primeiro contato com o aparato. Nesta etapa, os animais ficaram acondicionados em uma sala por 30 minutos antes do início da sessão, com temperatura controlada (30 °C). Para o início do treino, o animal foi colocado no contensor de acrílico localizado sobre uma manta aquecida. O manguito foi alocado na cauda do animal e foram realizadas 5 medidas ao longo de 5 minutos. Após essa sessão treino, os animais foram colocados novamente em suas caixas e acondicionados no biotério. No dia seguinte (Dia 2), sob as mesmas condições de aclimação, os animais foram acondicionados nos contensores e tiveram suas medidas da pressão arterial sistólica (PAS, em mm Hg) e frequência cardíaca (FC, em batimentos por minuto) coletadas (5 medidas em 5 minutos). Esta etapa foi denominada de aferição controle. No terceiro dia, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para indução de sepse e tiveram novamente os parâmetros acima descritos mensurados (sob mesmas condições e nos tempos citados previamente). Os dados (LabChart versão 7.0, AD Instruments, Austrália) foram tabelados e considerados como a média de 5 medidas por animal. O esquema a seguir (Figura 4) mostra a linha do tempo do protocolo experimental.



**Figura 4: Esquema temporal das aferições de pressão arterial e frequência cardíaca por pletismografia de cauda em animais naive, falso operados e CLP.** Desenho experimental mostrando a sequência ao longo de 48 horas de análise de pressão arterial sistólica e frequência cardíaca através da pletismografia de cauda que consiste em medições através de um manguito e um transdutor alocados na cauda do animal que se encontra em um contensor de acrílico. A sessão treino indica o primeiro contato do animal com o aparato, aferição controle é a medida de todos os animais antes de qualquer procedimento cirúrgico e as medidas nos tempos indicados (3; 6; 18; 24; 48 horas) foram mensuradas após a indução de sepse (CLP) ou falso-operados.

#### 4.4.3 Avaliação da Diurese e Análise de Parâmetros Urinários

Para avaliação da diurese, os animais dos grupos falso operado e CLP, logo após o procedimento cirúrgico, e os animais naive foram colocados em gaiolas metabólicas, sendo um animal por gaiola, com livre acesso a água e ração. Os animais foram mantidos nessas condições por 72 horas, com o objetivo de avaliar a quantidade de urina produzida durante a progressão da sepse. Ao longo destas 72 horas, o volume urinário foi mensurado nos tempos 3, 6, 12, 24, 28, 32, 36, 48, 52, 56, 60 e 72 horas após o procedimento cirúrgico. A partir destas coletas, dosagens de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , creatinina e ureia foram realizadas na fase inicial da sepse (6 horas), em uma fase tardia (48 horas) e em uma fase de recuperação (72 horas), a fim de avaliar o comprometimento da função renal ao longo da progressão do quadro de sepse.

#### 4.4.4 Avaliação de Hemograma

Com o intuito de quantificar os diferentes tipos de células sanguíneas durante a progressão da sepse, foram colhidos 100  $\mu\text{L}$  de sangue dos animais naïve e dos animais CLP nos tempos 6, 48 e 72 horas. As amostras foram coletadas em microtubos contendo EDTA (2 mg/ml) e colocadas em um leitor de amostras (modelo Horiba, ABX®, Micros 60; Montpellier, França). Os resultados foram expressos em porcentagem (hematócrito) ou em quantidade ( $10^3/\mu\text{L}$ ) de células brancas totais, hemoglobina total, plaquetas, linfócitos, monócitos e granulócitos.

#### 4.4.5 Dosagem Nitrito/Nitrato

Para as dosagens de nitrito e nitrato plasmáticos, foram coletadas amostras de sangue, as quais foram colocadas em tubos contendo EDTA (2 mg/ml). As amostras foram centrifugadas a 14500 r.p.m. por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. O método de Griess foi utilizado para mensurar, de forma indireta, os níveis de NO plasmático, chamado de NOx. Os procedimentos adotados estão bem detalhados em Bryan e Grisham (2007). Em resumo, as amostras (200  $\mu\text{L}$ ) foram diluídas e desproteinizadas com sulfato de zinco (1:10), incubadas por 1 hora a 0 °C e centrifugadas a 10000 r.p.m. por 15 minutos a 4 °C. Simultaneamente, curvas padrão de nitrito e nitrato foram preparadas (0 a 150  $\mu\text{M}$ ). As curvas padrão e 200  $\mu\text{L}$  das amostras (em duplicata) foram acondicionadas em placas de 96 poços para conversão do nitrato em nitrito, na qual foram incubadas a 37 °C por 3 horas na presença de *Escherichia coli* expressando a nitrato redutase, juntamente com os reagentes de conversão. As amostras foram centrifugadas novamente por 10 minutos a 3000 r.p.m. e 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi transferido para outra placa de

96 poços, na qual 100 µl do reagente de Griess foram adicionados e, após 10 minutos, realizada a leitura a 543 nm.

Este conjunto de experimentos iniciais, incluídos no item 4.4, foram realizados na tentativa de padronizar o modelo escolhido para este estudo, além de verificar as alterações cardíacas e renais promovidas durante diferentes estágios da sepse. A partir destes resultados, foram definidos os grupos experimentais utilizados. Para a análise do CLP escolhemos os grupos 6, 18 e 48 horas (chamados a partir deste ponto de 6h, 18h e 48h, respectivamente). Para o grupo controle, optou-se pela utilização dos animais do grupo naïve, principalmente pela semelhança dos resultados obtidos entre os animais deste grupo e os animais do grupo falso operado.

#### *4.5 Pressão Arterial e Fluxo Sanguíneo Renal (in vivo)*

##### *4.5.1 Procedimento Cirúrgico*

Para os procedimentos que permitiram a aferição da pressão arterial, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente; i.m.) e receberam doses suplementares (30 e 7 mg/kg, respectivamente) em intervalos de 45 minutos, quando necessário. Após verificar a ausência de resposta reflexa à dor, os animais foram colocados em decúbito dorsal sobre uma manta térmica (37 °C). Para obtenção do acesso venoso, a veia femoral esquerda foi dissecada para inserção de uma agulha (26 G ½) conectada a uma cânula de polietileno (PE 20) e à uma seringa de 1 ml. Este acesso foi utilizado para administração das substâncias testadas e para a administração inicial de 10 UI de heparina sódica diluída em 300 µl de PBS, a fim de evitar a formação de coágulos e obstrução das cânulas. Em seguida, uma incisão no pescoço foi realizada e a



artéria carótida direita foi localizada e cuidadosamente isolada do nervo vago e tecidos conjuntivos. O fluxo sanguíneo da porção distal da carótida foi interrompido com uma ligadura, enquanto o fluxo na porção proximal foi obstruído temporariamente com o auxílio de uma pinça. Foi realizado um corte na região medial da carótida e a inserção de um cateter de polietileno heparinizado. Este cateter foi conectado a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição digital de dados (PowerLab 8/30, AD Instruments, Austrália), no qual valores de pressão arterial média (PAM), sistólica e diastólica (em mm Hg) e frequência cardíaca (FC, em bpm) foram registrados através do software LabChart versão 7.2 (AD Instruments, Austrália).

Simultaneamente a esta análise, foi realizada uma tricotomia no lado direito da região abdominal dos animais, no qual botões de lidocaína foram administrados a fim de promover um bloqueio reflexo local. Uma incisão abdominal unilateral para localização do rim direito dos animais. As vísceras foram afastadas e um sensor à laser foi posicionado sobre o rim, sem pressioná-lo. Esta sonda permaneceu acoplado a um sistema de leitura de fluxo sanguíneo e temperatura por laser *doppler* (*Laser Doppler Perfusion and Temperature Monitor*, modelo VMS-LDF2, Moor Instruments, Reino Unido). Ao término dos experimentos, os animais foram mortos por sobredosagem de anestésico i.v.

#### *4.5.2 Efeito da Administração de Fenilefrina, Vasopressina e Noradrenalina na Pressão Arterial e no Fluxo Sanguíneo Renal, in vivo, de Ratos Naive e CLP*

A fim de avaliarmos os efeitos da administração de vasopressina e noradrenalina na pressão arterial e no fluxo sanguíneo renal de animais naive ou submetidos à CLP (6, 18 e 48 horas após indução da sepse), após o procedimento cirúrgico descrito no item 4.4.1, foi respeitado um período de estabilização

de 20 minutos antes do início das administrações dos fármacos acima citados. Foram realizadas curvas de relação dose-efeito para AVP (6, 20 e 60 pmol/kg, i.v.) e para Nor (2, 6 e 20 nmol/kg, i.v.), respeitando-se um intervalo de 10 minutos entre as administrações, ou ainda, o retorno dos parâmetros mensurados ao estado basal quando este foi maior do que o tempo de 10 minutos. Ao final do protocolo, uma dose única de fenilefrina (20 nmol/kg) foi administrada seguida da eutanásia dos animais.

#### *4.6 Dosagem da Vasopressina Plasmática*

Para a dosagem de vasopressina plasmática foram coletadas amostras de sangue (500 uL) em tubos contendo EDTA (2 mg/ml). As amostras foram centrifugadas à 14500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. A dosagem de vasopressina foi realizada através de um kit de imunoenensaio (Arginine Vasopressin EIA Kit, Cayman Chemical). A leitura foi feita no leitor de placas (TECAN) a 420 nm, pela absorbância, e a análise foi realizada por meio de interpolação de dados a partir da curva padrão obtida.

#### *4.7 Preparações Isoladas: Rim e Aorta (in vitro)*

##### *4.7.1 Procedimento Cirúrgico*

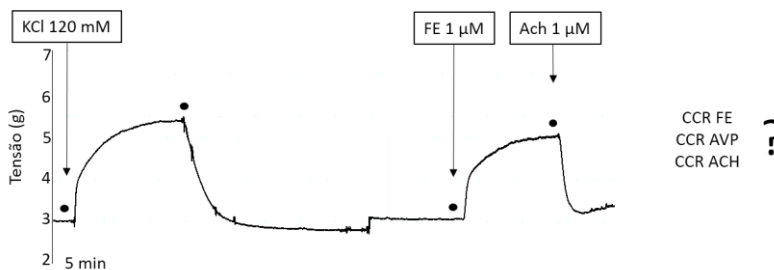
Para isolar o rim esquerdo dos animais utilizou-se a técnica descrita por Tölle *et al.* (2010) com algumas modificações (GUARIDO *et al.*, 2014). Brevemente, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente, i.p.) e heparinizados (100 UI via i.p.). Após a obtenção do estado de anestesia geral, os animais foram

posicionados em decúbito dorsal e uma laparotomia foi realizada para exposição dos órgãos abdominais. Após ligadura do ureter esquerdo, a aorta abdominal foi isolada da veia e de seus tecidos conectivos e uma ligadura foi posicionada abaixo da artéria renal direita e acima da artéria renal esquerda. Um cateter acoplado a uma bomba de perfusão foi inserido na porção distal da aorta. O fluxo sanguíneo foi interrompido por meio da ligadura e a bomba de perfusão foi acionada de modo que a solução salina fisiológica (PSS, em mM, NaCl 131,3, KCl 4,7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,18,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,17,  $\text{NaHCO}_3$  14,9, Dextrose 5,5,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,6, EDTA 0,08) com fluxo de 4 ml/min, a 37 °C e aerado com mistura carbogênica (95%  $\text{O}_2$ / 5%  $\text{CO}_2$ ) perfundisse o rim esquerdo. O órgão foi removido da cavidade abdominal e acoplado a um sistema de perfusão sob as mesmas características descritas acima. Mudanças na pressão de perfusão vascular renal (PPVR, em mm Hg), registradas a partir do transdutor de pressão acoplado ao circuito de perfusão, determinaram os diferentes estados contráteis dos vasos do leito renal. Este transdutor acoplado ao sistema de aquisição (modelo PowerLab, AD Instruments, Austrália), capta estas mudanças, as quais foram expressas na forma de pressão de perfusão (em mm Hg) da preparação.

A aorta torácica dos mesmos animais utilizados para alguns dos experimentos realizados com rim isolado e perfundido foi removida cuidadosamente e colocada em uma placa de Petri contendo PSS para retirada dos tecidos conjuntivos e secção em forma de anéis de 3 a 4 mm de comprimento. Dois ganchos metálicos foram inseridos na luz dos mesmos, sendo, em seguida, transferidos para cubas de vidro (50 mL) contendo solução fisiológica e conectadas ao transdutor de tensão isométrica acoplado a um sistema de aquisição de dados (modelo PowerLab, AD Instruments, Austrália). Nestas preparações, a tensão basal utilizada foi de 3 g e durante todo o protocolo experimental os anéis foram mantidos com solução nutritiva a 37° C, pH 7,4 e borbulhada continuamente com mistura carbogênica (95%  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ ).

#### *4.7.2 Avaliação da Reatividade Vascular à Vasopressina, Fenilefrina e Acetilcolina em Anéis de Aorta Isolados de Ratos Naive e CLP*

Após a retirada da aorta e sua montagem nas cubas para órgão isolado e um período de estabilização de 60 minutos, no qual a PSS foi trocado a cada 15 min, a solução nutritiva das cubas foi substituída por PSS com altas concentrações de cloreto de potássio, chamada de KCl (120 mM), para teste de atividade biológica das preparações de aorta. Após alcançar o platô, ou seja, a estabilização da resposta vasoconstritora induzida pelo KCl, as preparações foram lavadas três vezes consecutivas e passaram por um novo período de estabilização de 30 minutos, com troca da PSS a cada 15 minutos. Em seguida, as aortas foram estimuladas com fenilefrina (1  $\mu$ M) e após atingir o platô de contração, as preparações receberam acetilcolina (1  $\mu$ M). Esta etapa foi realizada para observar a integridade de endotélio vascular, uma vez que as aortas foram consideradas viáveis para os protocolos seguintes quando o relaxamento induzido pela acetilcolina foi de no mínimo 85%. Após um novo período de estabilização de 1 hora, no qual o líquido nutritivo foi trocado a cada 15 minutos, foram realizadas curvas concentração-resposta para fenilefrina (1 nM – 100  $\mu$ M), vasopressina (0,1 nM – 3  $\mu$ M) e acetilcolina (1 nM – 3  $\mu$ M). Cada preparação foi exposta a uma única CCR (de um único agonista). O registro típico na Figura 5 ilustra o desenho experimental descrito neste item.



**Figura 5: Registro típico do teste da viabilidade tecidual e avaliação de endotélio funcional em anéis de aorta isolada de animal naíve.**

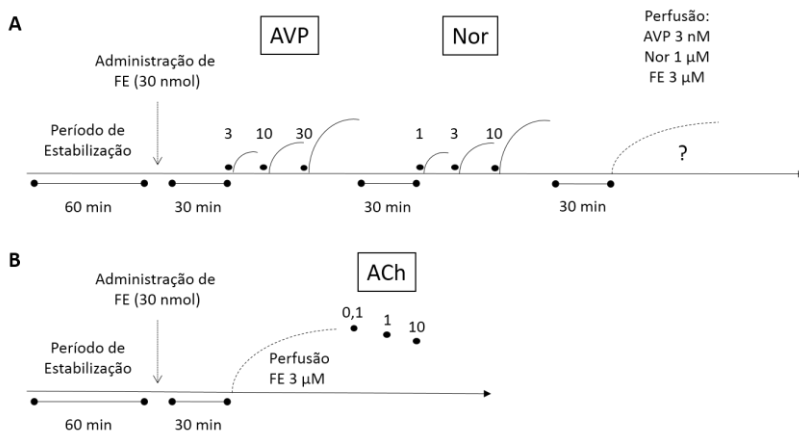
Primeiramente, os anéis foram testados quanto à viabilidade das preparações seguido do teste de integridade do endotélio (endotélio funcional com relaxamento entre 85-100%). Após um novo período de estabilização, curvas concentração-resposta (CCR) cumulativas para fenilefrina (FE) ou vasopressina (AVP) foram realizadas. Para CCR à acetilcolina (ACh), as preparações foram pré-contraídas com fenilefrina (1 µM).

#### *4.7.3 Avaliação da Resposta Contrátil à Vasopressina, Noradrenalina e Fenilefrina no Leito Vascular Renal Obtido de Animais Naíve e CLP*

O rim esquerdo dos animais naíve e dos animais dos grupos CLP 6, 18 e 48 horas foram isolados conforme descrito no item 4.6.1 e, após uma hora de estabilização, foi administrado fenilefrina (FE 30 nmol) para testar a viabilidade do leito renal isolado. Após mais 30 minutos, curvas dose-resposta (CCR) não cumulativas para vasopressina (3, 10 e 30 pmol) ou para noradrenalina (1, 3 e 10 nmol) ou fenilefrina (3, 10 e 30 nmol), foram realizadas. As preparações também foram perfundidas com vasopressina (3 nM), noradrenalina (1 µM) ou fenilefrina (3 µM) por 30 minutos, a fim de avaliar a manutenção da resposta contrátil ao longo do tempo analisado. A Figura 6A mostra o esquema do protocolo experimental descrito neste item.

#### 4.7.4 Avaliação da Resposta Vasodilatadora à Acetilcolina na Pressão de Perfusão Vascular Renal *in vitro* em Animais Naive e CLP

Após o mesmo período de estabilização e teste de viabilidade do órgão descritos no item 4.7.3, os rins de animais dos grupos naive, CLP 6h, CLP 18h e CLP 48h foram perfundidos com fenilefrina ( $3 \mu\text{M}$ ) por 30 minutos, e a CCR não cumulativa para acetilcolina (ACh 0,1, 1 e 10 nmol) foi realizada. Este desenho experimental está representado na Figura 6B.



**Figura 6: Esquema representativo dos protocolos experimentais em rim isolado e perfundido.** Em A, curva concentração resposta para vasopressina (3, 10 e 30 pmol) e noradrenalina (1, 3 e 10 nmol) e avaliação do efeito da perfusão contínua de vasopressina (3 nM), noradrenalina (1  $\mu\text{M}$ ) e fenilefrina (3  $\mu\text{M}$ ) em ratos naive e CLP (6, 18 e 48 horas). Em B, avaliação da resposta à acetilcolina (0,1, 1 e 10 nmol) em rins previamente perfundidos com fenilefrina (3  $\mu\text{M}$ ) em ratos naive e CLP (6, 18 e 48 horas). FE, fenilefrina; AVP, vasopressina; Nor, noradrenalina; ACh, acetilcolina.

#### *4.7.5 Avaliação da Resposta Constritora à Vasopressina e à Fenilefrina na Ausência de Cálcio Extracelular*

O protocolo descrito a seguir foi realizado com o objetivo de avaliar a participação do cálcio liberado do retículo sarcoplasmático no aumento da responsividade vascular renal à vasopressina. Após o período de estabilização de 60 minutos seguido do teste de viabilidade da preparação, foi realizada a curva dose-resposta não cumulativa para vasopressina ou para fenilefrina. Após 30 minutos, o líquido nutritivo foi substituído por PSS sem cloreto de cálcio em sua composição durante 15 minutos. Após esse período, foi acrescentado à PSS sem cálcio, vasopressina (3 nM) ou fenilefrina (3  $\mu$ M). Um novo período de estabilização foi aguardado (15 minutos) e uma curva dependente da dose não cumulativa para  $\text{CaCl}_2$  (10 nmol a 30  $\mu$ mol) foi realizada.

#### *4.7.6 Avaliação da Contratilidade à Vasopressina na Presença do Inibidor da Rho-quinase no Rim Isolado e Perfundido de Ratos Naive e CLP*

Para investigar a participação da via Rho-A/Rho-quinase na reatividade da vasopressina em rim isolado e perfundido de ratos submetidos ao modelo de sepse, foi utilizado um inibidor da enzima ROCK, o composto Y-27632. Para isso, após o período de estabilização e teste de viabilidade do tecido, foi realizada a curva não cumulativa para a vasopressina (3, 10 e 30 pmol). Após 30 minutos, o composto Y-27632 foi acrescentado à PSS (nas concentrações de 0,3 ou 1  $\mu$ M). Após 15 minutos, uma nova curva dose-resposta para vasopressina (3, 10 e 30 pmol) foi realizada na presença deste inibidor.

#### *4.7.7 Avaliação do Papel do Receptor V1a no Aumento da Pressão de Perfusão Renal Induzida pela Vasopressina em Animais Naive e CLP*

A fim de avaliar o papel dos receptores V1a no aumento à reatividade da vasopressina em rim isolado e perfundido de ratos Naive e submetidos ao modelo de CLP, foi utilizado o antagonista deste receptor, DTM-AVP. Após o período de estabilização e teste de viabilidade do tecido, as preparações foram expostas as doses não cumulativas de vasopressina (3, 10 e 30 pmol). Em seguida, as preparações foram perfundidas com PSS contendo DTM-AVP (10 nM) e após 15 minutos uma nova curva dose-resposta para vasopressina (3, 10 e 30 pmol) foi realizada.

### *4.8 Western Blot*

#### *4.8.1 Preparo da Amostra*

Para coleta das amostras, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente; i.p.). Uma incisão torácica-abdominal foi realizada e um cateter tipo *butterfly*, acoplado ao sistema de perfusão, foi inserido no ventrículo cardíaco esquerdo. Os órgãos foram perfundidos com solução salina 0,9%, a 4 °C. Após 5 minutos, tempo suficiente para a perfusão de aproximadamente 150 ml de solução salina, os animais foram sacrificados e o rim esquerdo coletado. Para a análise, o córtex renal foi separado da medula renal e foram colocados em tubos e mantidos em nitrogênio líquido até o armazenamento à -80 °C.

As amostras foram transferidas do freezer - 80 °C para um isopor contendo nitrogênio líquido. Aproximadamente 200 mg de



cada tecido (mantido em nitrogênio líquido) foram pulverizados e colocados em microtubos plásticos contendo 300 µL de tampão de lise (composição: PMSF, coquetel inibidor de proteases, ortovanadato e T-Per). As amostras foram homogeneizadas, sonicadas por 5 segundos a uma potência de 60 Watts e incubadas em gelo por 1 hora. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 15000 r.p.m. por 30 minutos a 4 °C. A dosagem de proteína baseou-se no método de Smith, também conhecido como BCA (SMITH *et al.*, 1985). Para isto, 6 µl do sobrenadante de cada amostra foram transferidos para um novo microtubo e diluídos em 24 µl de tampão de lise (1:6). Em uma placa de 96 poços, a curva padrão foi preparada, utilizando-se BSA, e colocada na primeira coluna da placa, que foi completada com as amostras. Em cada poço foram acrescentados 100 µl de BCA (ácido bicinonínico 4,4'-dicarboxi-2,2'- biquinolina) e a placa foi incubada por 1 hora a 37 °C. Após este período, a dosagem foi realizada no leitor de placas à 570 nm. O restante do sobrenadante das amostras foi quantificado e transferido para um novo microtubo e acrescido de tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970), na proporção de 1:1 e incubado a 95 °C por 10 minutos. As amostras foram estocadas em temperatura -80 °C até a realização da imunoeletroforese.

#### 4.8.2 Técnica e Análise de Dados

A eletroforese foi realizada utilizando-se gel de separação e de entrada, ambos de poliácridamida, 10 e 5%, respectivamente. As amostras, juntamente com o padrão (Precision Plus Protein™ Standards, Kaleidoscope™, BioRad), foram colocadas nos poços do gel e um tampão de corrida foi adicionado dentro do suporte, no qual estava a cuba contendo o gel. A corrida foi realizada durante 3 horas a 90 V. Em seguida iniciou-se o processo de transferência, no qual as proteínas que estavam contidas no gel foram transferidas para a membrana de nitrocelulose ao longo de

1 hora, a 100 V e sob temperatura de 4 °C. Em seguida, a membrana foi corada com Ponceau e lavada com TBS-T durante 30 minutos, sob agitação. A membrana foi incubada com TBS-T milk 5% por mais uma hora.

A revelação ocorreu por quimioluminescência. Para isto, a membrana foi incubada com anticorpo primário, a 4 °C, *overnight*. Na manhã seguinte, as membranas foram lavadas com TBS durante 30 minutos e colocadas na presença dos anticorpos secundários por 1 hora em temperatura ambiente. Após este período, as membranas foram lavadas novamente com TBS-T por 30 minutos. Para o processo de revelação, as membranas foram colocadas na presença de solução ECL Plus (Thermo Scientific, EUA) durante 1 minuto e, em seguida, foram acondicionadas na reveladora (ChemiDoc™ XRS+, Bio-Rad Laboratories, Inc., Berkeley, California, USA). Os períodos de exposição variaram de 1 segundo a 10 minutos, de acordo com a proteína analisada. A análise quantitativa das bandas foi realizada por densitometria, com o auxílio do programa ImageJ (versão 1.44, NIH, EUA). As proteínas em questão analisadas foram: receptor de vasopressina (V1a), Rho-A total, ROCK I e ROCK II, MYPT1 total, MYPT1 fosforilada (Thr 696), serca 2 e receptor de IP3.

#### 4.9 Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média, mediana ou porcentagem  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Os gráficos e as análises estatísticas foram realizadas com GraphPad Prism versão 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Para análise dos testes paramétricos, pareados ou não pareados, utilizou-se teste de análise de variância de uma via (ANOVA) ou de duas vias, seguidos pelo teste post hoc de Dunnett ou Bonferroni. O nível de significância considerado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5. Resultados

Os resultados a seguir foram agrupados em três subdivisões, com o objetivo de facilitar a compreensão da sequência apresentada neste documento.

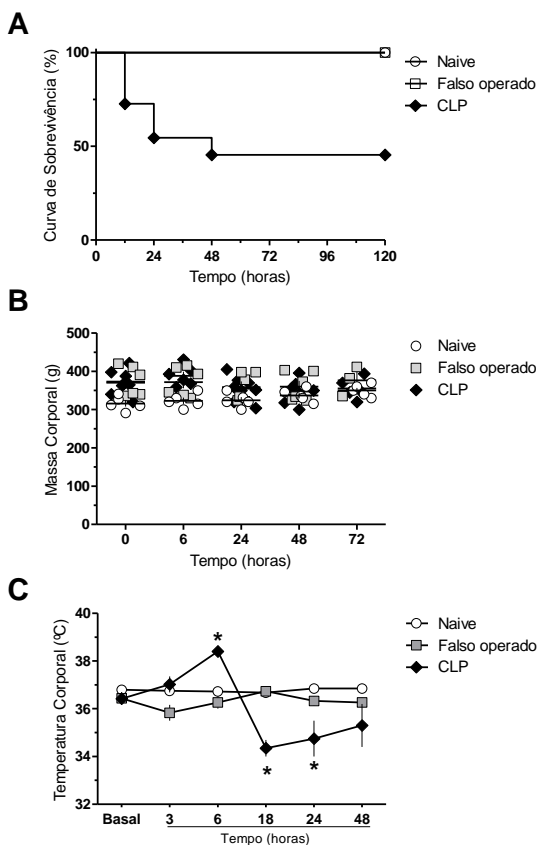
### **5.1 Parte 1: Caracterização da Sepse Induzida pelo Modelo de Ligadura e Perfuração do Ceco.**

A primeira parte dos resultados descritos a seguir foram realizados a fim de caracterizar, com base nos eventos clínicos descritos no choque séptico em humanos, as alterações cardíacas, renais e hematológicas resultantes do modelo CLP.

#### *5.1.1 Alterações Indicativas de um Estado do Tipo Séptico e no Sistema Cardiovascular Induzidas por CLP*

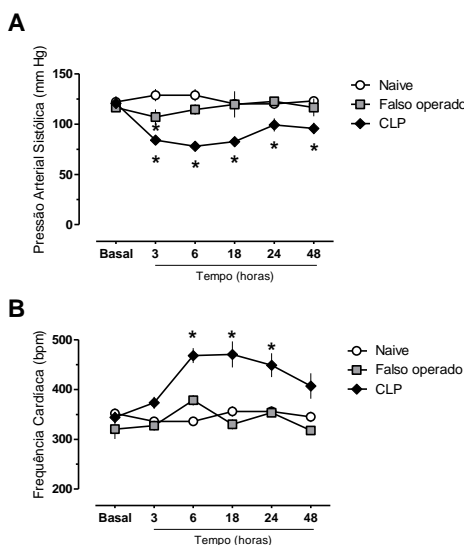
A Figura 7A demonstra a taxa de sobrevivência dos animais submetidos ao modelo descrito. Pode-se observar uma taxa de mortalidade de aproximadamente 50% nos animais submetidos à CLP nas primeiras 48 horas após a indução da sepse. Simultaneamente, é possível observar que não houve perda de massa significativa nos animais sépticos ao longo das 72 horas analisadas (Figura 7B). Além disso, a avaliação da temperatura corporal (Figura 7C) dos animais CLP revelou o aumento significativo da temperatura nas horas iniciais após a indução da sepse (6 horas), com queda significativa na 18ª hora e retorno a níveis semelhantes aos controles no final da análise (48ª hora). A Figura 7 também nos mostra a similaridade entre os animais dos grupos naïve e falso operado nos parâmetros avaliados, excluindo a influência das alterações observadas com

o procedimento anestésico e cirúrgico nos quais os animais falso operados foram submetidos.



**Figura 7: Avaliação da taxa de sobrevivência, da massa e da temperatura corporal na progressão do quadro séptico.** Após a indução de sepse por CLP (símbolos pretos), além dos grupos falso operado (símbolos cinzas) e naive (símbolos brancos), foram avaliados taxa de mortalidade (A), parâmetros de massa (B) e temperatura corporal (C). Dados expressos em porcentagem (A); em valores individuais e mediana (B); e em média  $\pm$  erro padrão da média em C ( $n$  de 5-8 animais por grupo experimental). \* representa valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo sham com significância de 0,05. ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguidas de Bonferroni.

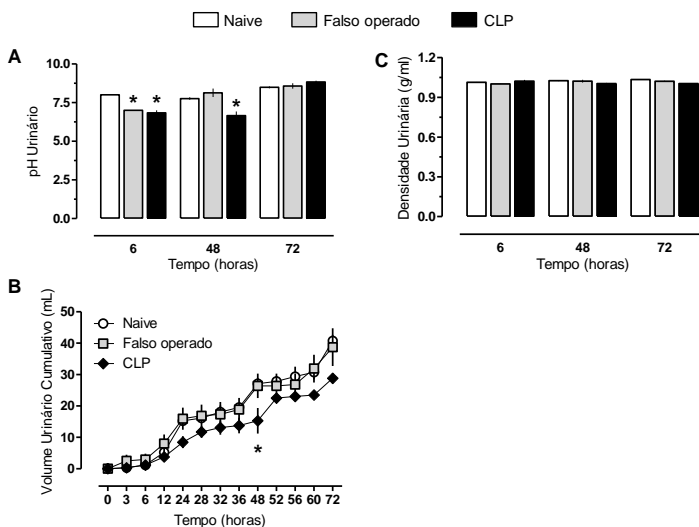
Foi observado ainda, através da pletismografia de cauda, a redução da pressão arterial sistólica em 35% na sexta hora após indução de sepse por CLP, quando comparado ao grupo naive. Essa redução foi mantida, ainda que em menor intensidade, até o fim da análise (Figura 8A). Simultaneamente a essa queda na PA, foi observado um aumento da frequência cardíaca a partir da sexta hora, sustentada até a 24<sup>a</sup> hora, que retornou a valores similares aos basais na 48<sup>a</sup> hora após a CLP (Figura 8B). Novamente, não observamos alterações significativas entre os valores obtidos nos animais do grupo falso operado, quando comparados aos animais do grupo naive.



**Figura 8: Redução da pressão arterial sistólica e aumento da frequência cardíaca induzidos pela CLP.** Além da aferição basal, os animais naive, falso operados e submetidos à CLP tiveram a pressão arterial sistólica (A) e a frequência cardíaca (B) mensuradas nos tempos 3, 6, 18, 24 e 48 horas após a indução da sepse (n de 5 a 15 animais por grupo experimental). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. \* representa diferença estatística em relação a análise do grupo controle (naive), com significância de  $p \leq 0,05$ . ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguidas de Bonferroni.

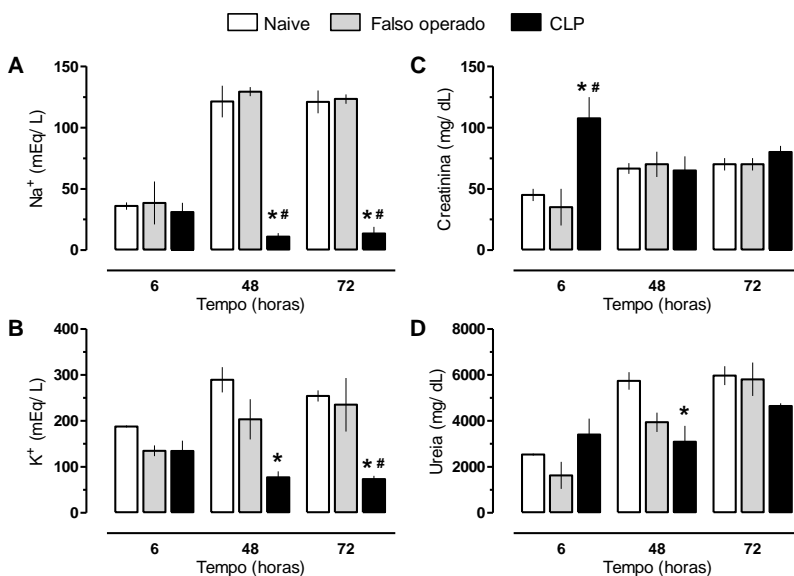
### 5.1.2 Alterações da Função Renal após a CLP

A urina coletada durante o protocolo utilizando gaiolas metabólicas, além de quantificada também foi utilizada para avaliar a função renal dos animais submetidos à CLP (Figuras 9 e 10). Esta análise nos permitiu observar que o pH urinário dos animais, assim como a quantidade de urina coleta ao longo das 72 horas estavam reduzidas quando comparados ao grupo naive (Figura 9A e 9B, respectivamente). Contudo, apesar da redução do volume urinário final, a densidade da urina não foi alterada (Figura 9C).



**Figura 9: Acidez urinária acompanhada de redução de diurese em animais submetidos à CLP.** Após a indução de sepse por ligadura e perfuração do ceco, os animais chamados CLP, os naive e os animais falso operados foram alocados em gaiolas metabólicas para avaliação do pH (A), quantificação de volume urinário (B) e densidade urinária (C). Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n de 6 animais por grupo experimental). \* representa diferença significativa em relação ao grupo naive com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguidas de Bonferroni.

A avaliação da excreção renal de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ) apresentadas nas Figuras 10A e 10B, respectivamente, mostra a redução na excreção destes íons na 48ª e na 72ª hora após CLP. Quanto à excreção de metabólitos, como creatinina (Figura 10C), podemos observar um aumento significativo na sexta hora, mas não em 48 ou 72 horas após a CLP, quando comparados aos grupos falso operado e naíve. Já a excreção de ureia, observada na Figura 10D, apresentou-se reduzida no grupo CLP na 48ª hora, quando comparada ao grupo naíve.



**Figura 10: Redução da excreção de sódio, potássio e ureia na urina de animais sépticos.** Avaliação dos valores de sódio (A), potássio (B), creatinina (C) e ureia (D) após indução de sepse por modelo de ligadura e perfuração do ceco. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n de 3 a 6 animais por grupo). \* representam valores estatisticamente diferentes em relação a análise do grupo controle (naíve barras brancas) com significância de 0,05. Dados seguidos de # são significativamente diferentes dos animais do grupo falso operado (barras cinzas) com  $p \leq 0,05$ . ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni.

Através das alterações até aqui mencionadas (itens 5.1.1 e 5.1.2), o modelo CLP demonstrou-se eficaz para estudos que se propõem a investigar as alterações cardiovasculares e renais promovidas pela sepse. E ainda, a semelhança dos resultados entre os animais do grupo naïve e os animais do grupo falso-operado (sham) possibilitou a escolha de um único grupo experimental controle. Para os próximos resultados descritos, o grupo CLP será sempre comparado ao grupo naïve que, a partir de agora, será chamado de grupo controle.

### *5.1.3 Alterações Hematológicas Induzidas pela Sepse*

A fim de ampliar as análises acerca das alterações induzidas pelo modelo de CLP, outras comparações foram realizadas entre animais controle e animais dos grupos CLP. A Tabela 4 apresenta valores do hemograma completo obtido de animais dos grupos controle e CLP (em 6, 48 e 72 horas após indução da sepse), além da dosagem de nitrito/nitrato, como indicativo indireto da produção de óxido nítrico (NO). Podemos observar que a partir da sexta hora algumas alterações hematológicas já podem ser notadas, como a redução na concentração de linfócitos sanguíneos ( $9,5 \pm 0,9$  e  $2,3 \pm 0,3$  nos animais controle e CLP 6 horas, respectivamente). Já o número de plaquetas encontra-se reduzido a partir da 48<sup>a</sup> hora após CLP. Além disso, a quantificação de NO plasmático tornou-se significativamente diferente dos valores encontrados no grupo controle a partir da 48<sup>a</sup> hora. Contudo, a janela de análise não nos permite concluir sobre a produção de NO no período intermediário.



**Tabela 4: Análise de hemograma e dosagem plasmática de nitrito em animais do grupo controle e nos tempos 6, 48 e 72 horas após indução de sepse.**

	Controle	CLP 6 h	CLP 48 h	CLP 72 h
Leucometria ( $10^3/\mu\text{L}$ )	13,9 $\pm$ 1,3	13,4 $\pm$ 1	15,3 $\pm$ 1,4	12,4 $\pm$ 2
Hemoglobina ( $10^3/\mu\text{L}$ )	12,1 $\pm$ 0,2	13,4 $\pm$ 0,5	12,5 $\pm$ 0,5	11,6 $\pm$ 0,3
Hematócrito (%)	46,2 $\pm$ 0,7	51,4 $\pm$ 1,9	47,4 $\pm$ 2,2	43,7 $\pm$ 1,4
Plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ )	1018 $\pm$ 36	734 $\pm$ 59	646 $\pm$ 126*	647 $\pm$ 110*
Linfócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	9,5 $\pm$ 0,9	2,3 $\pm$ 0,3*	5,2 $\pm$ 1,1*	8,5 $\pm$ 0,6
Monócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	2,3 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 0,7	6,8 $\pm$ 0,9*
Granunócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	2,1 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,6	1,8 $\pm$ 0,4	4,7 $\pm$ 0,3*
NOx ( $\mu\text{M}$ )	6,5 $\pm$ 2,4	55,2 $\pm$ 7,5	129 $\pm$ 29,2*	94,4 $\pm$ 35,5

Análise quantitativa de células do sangue e de nitrito plasmático de animais controle ou com sepse induzida por ligadura e perfuração do ceco (n de 5 animais por grupo). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Dados seguidos de \* apresentam nível de significância menor ou igual a 0,05 quando comparado ao grupo controle. ANOVA de uma via seguida de Dunnett.

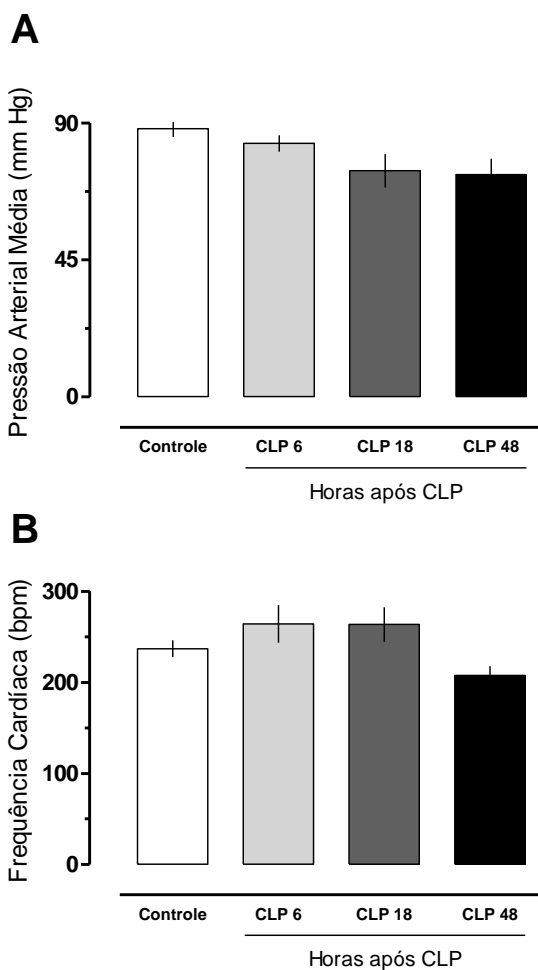
Conforme já mencionado, os animais do grupo naive foram escolhidos como o grupo controle deste estudo. Quanto aos horários para melhor análise da nossa proposta, foram escolhidos os grupos previamente avaliados: o grupo CLP 6 horas (fase hiperdinâmica pós indução de sepse) e o grupo CLP 48 horas (fase hipodinâmica após indução da sepse). Além disso, foi acrescentado um novo grupo experimental (CLP 18 horas) com a finalidade de avaliar as alterações transitórias da sepse em um ponto intermediário. Esse grupo 18 horas também foi escolhido por ser um horário que antecede a faixa temporal de maior mortalidade dos animais (~50% entre 24 e 48 horas), não fazendo assim distinção dos sobreviventes e não-sobreviventes da sepse.

## **5.2 Parte 2: Avaliação da Reatividade à Vasopressina Durante a Progressão do Choque Séptico**

Após a comprovação de que a metodologia de CLP moderada afeta as funções cardiovasculares e renais, corroborando com diversos achados clínicos similares aos descritos por este modelo, foi investigado o efeito *in vivo* e *in vitro* da administração de vasopressina. A vasopressina foi utilizada por ser o alvo deste estudo; a noradrenalina por ser a substância de primeira escolha no tratamento farmacológico de pacientes com sepse; e a fenilefrina pelo número de estudos envolvendo a resposta a esse vasoconstritor na sepse.

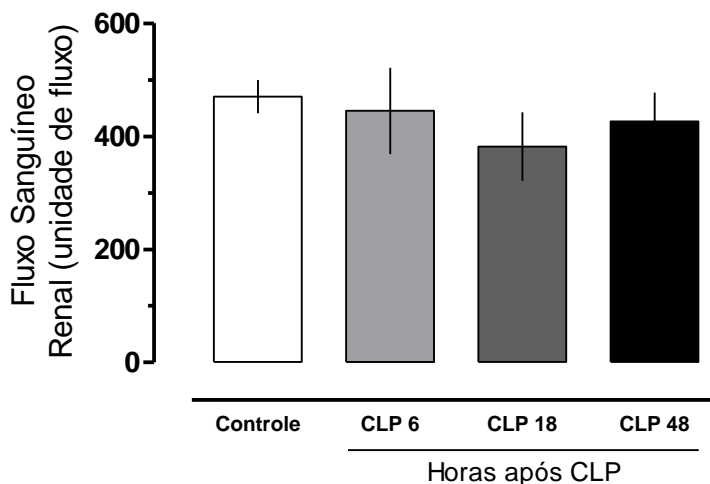
### *5.2.1 Manutenção da Pressão Arterial Média, Frequência Cardíaca e Fluxo Sanguíneo Renal e Redução da Reatividade Sistêmica à Fenilefrina em Animais Submetidos ao Modelo de Seps*

A avaliação inicial dos valores basais da pressão arterial média (PAM, em mm Hg) e da frequência cardíaca (FC, em bpm) em animais anestesiados foram mensurados nos tempos 6, 18 e 48 horas após a CLP. É possível notar que apesar dos animais do grupo CLP 48 horas apresentarem redução na pressão arterial média de aproximadamente 15 mm Hg (88,2 e 74,4 mm Hg nos grupos controle e CLP 48 horas, respectivamente) e um aumento na frequência cardíaca em aproximadamente 10% quando comparados ao grupo controle (237 e 263 bpm nos grupos controle e CLP 48 horas, respectivamente) não houve qualquer diferença significativa nos grupos CLP quando comparados aos animais do grupo controle (Figuras 11A e 11B, respectivamente). O mesmo foi observado na pressão arterial sistólica e diastólica mensuradas simultaneamente à PAM e a FC (dados não mostrados).



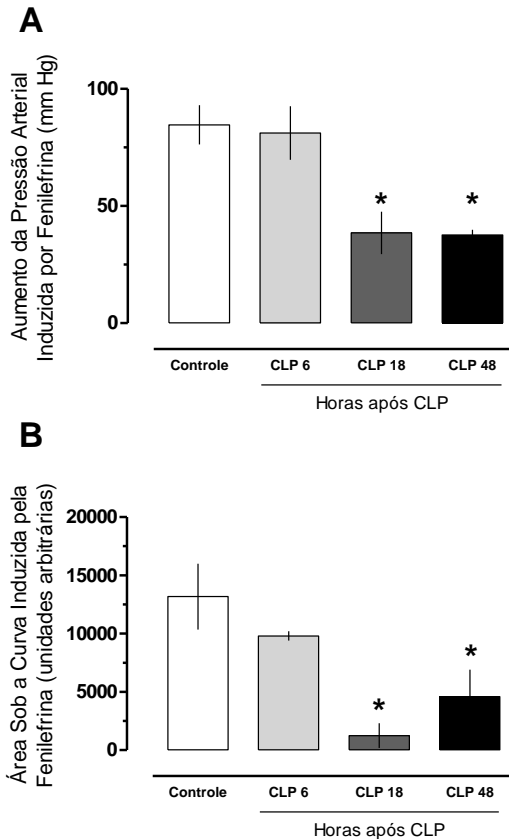
**Figura 11: Pressão arterial média e frequência cardíaca basais em animais anestesiados e submetidos à CLP.** Análise basal da pressão arterial (A) e frequência cardíaca (B) pela canulação da carótida de animais anestesiados controle ou CLP (6, 18 e 48 horas). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n de 5 a 6 animais por grupo). ANOVA de uma via.

Além disso, a avaliação do fluxo sanguíneo renal (FSR) basal (Figura 12) não mostrou qualquer diferença significativa entre os grupos experimentais, não comprometendo o aporte de oxigênio para o leito renal nos animais CLP.



**Figura 12: Manutenção do fluxo sanguíneo cortical renal basal em animais CLP quando comparados ao grupo controle.** Análise do fluxo sanguíneo renal por Laser Doppler em animais anestesiados (controle ou CLP 6, 18 e 48h). Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n de 4 a 6 animais por grupo. ANOVA de uma via.

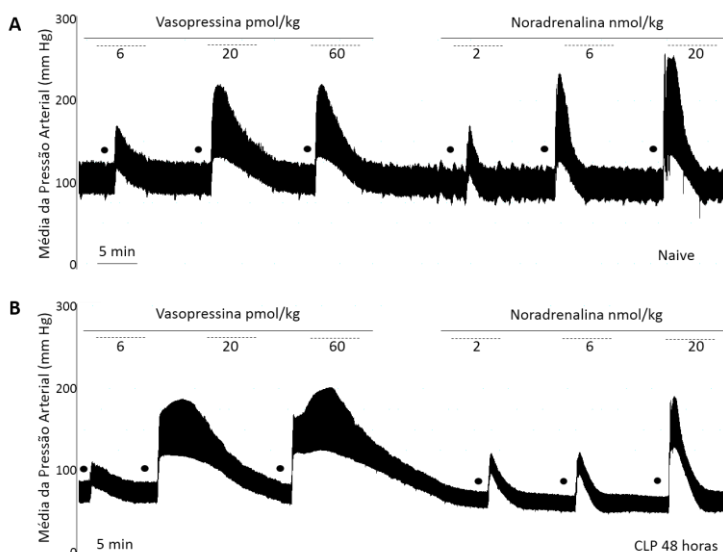
Outra característica avaliada foi a hiporreatividade à fenilefrina (agonista  $\alpha 1$  adrenérgico). Pode-se observar que tanto os animais do grupo 18 horas quanto os animais do grupo 48 horas após CLP apresentaram hiporresponsividade à administração de dose única de FE (20 nmol/kg). Este efeito pode ser observado tanto na resposta máxima (Figura 13A) quanto na área sob a curva (Figura 13B) que, respectivamente, mostram os valores de pico do efeito vasopressor e reflete, indiretamente, o tempo de duração deste efeito.



**Figura 13: Redução da refratariedade induzida pela fenilefrina em animais sépticos.** Avaliação do efeito na pressão arterial, em animais anestesiados, após administração de 20 nmol/kg de fenilefrina em ratos controle ou submetidos à CLP e analisados 6, 18 e 48 horas após a indução de sepse. Em A, avaliação do efeito máximo da fenilefrina (20 nmol/kg) na pressão arterial e em B, avaliação da área sob a curva induzida pela resposta da fenilefrina (20 nmol/kg). Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n de 4 no grupo controle e CLP 6h, de 5 no grupo CLP 18h e 6 animais no grupo CLP 48h). \* representa diferença significativa entre os grupos CLP em relação ao grupo controle com nível de significância menor ou igual a 0,05. ANOVA de uma via seguida de Dunnett.

### 5.2.2 Elevação da Pressão Arterial Sistêmica e Redução do Fluxo Sanguíneo Renal Induzidos Pela Vasopressina e Noradrenalina em Animais CLP

Após o período de estabilização foram realizadas curvas dose-resposta para vasopressina (6, 20 e 60 pmol/kg) e noradrenalina (2, 6 e 20 nmol/kg) nos animais controle ou submetidos à CLP. O registro típico abaixo (Figura 14) exemplifica o protocolo experimental realizado nesta etapa. Nota-se que os registros abaixo são de um animal controle e um CLP 48 horas. No entanto, vale ressaltar que este protocolo experimental também foi realizado nos grupos CLP 6 e 18 horas.

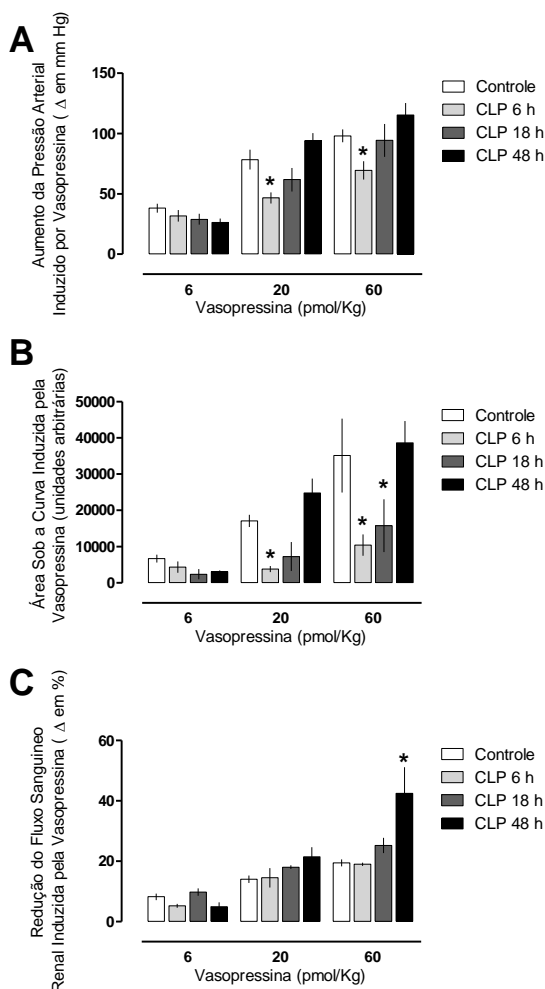


**Figura 14: Registros típicos dos experimentos realizados para avaliar a resposta pressórica da AVP e Nor em ratos controle e submetidos à CLP.** Registro típico da pressão arterial após a administração *in bolus* de doses crescentes de vasopressina (6, 20, 60 pmol/kg) e noradrenalina (2, 6 e 20 nmol/kg), respeitando os intervalos entre cada administração. Animais controle (A) ou submetidos à CLP (B).

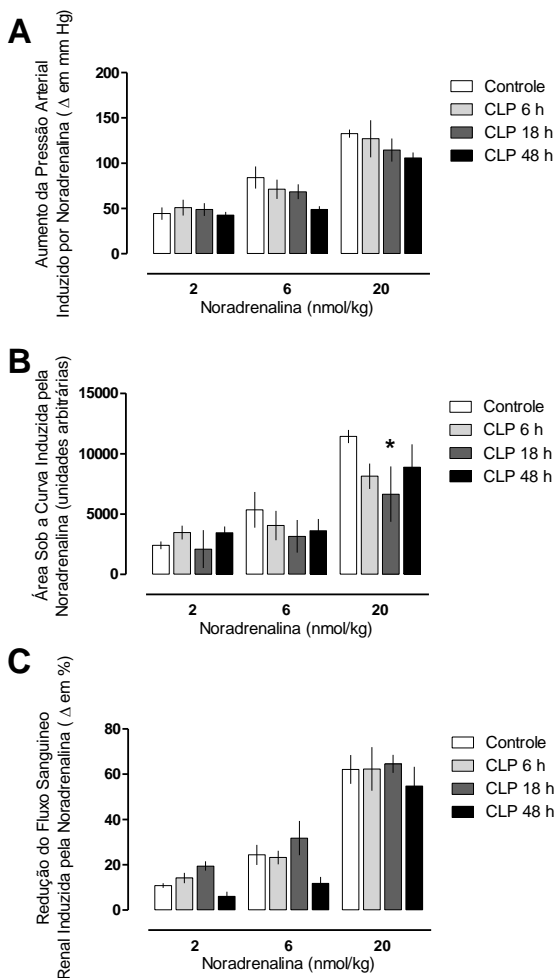
É possível observar que a vasopressina eleva a pressão arterial de maneira dependente da dose (Figuras 15A e 15B) em ambos os grupos controle e CLP. Contudo, o grupo CLP 6 horas demonstrou uma redução de resposta nas doses de 20 e 60 pmol/kg tanto na resposta máxima (15A) quanto na análise da área sob a curva (15B). Já o grupo CLP 18 horas mostrou-se hiporreativo somente na análise da área sob a curva. A redução do fluxo sanguíneo do córtex renal (Figura 15C) em resposta a administração de vasopressina não mostrou-se alterada nos grupos CLP 6 e 18 horas, diferentemente do que foi mostrado na análise da pressão arterial. Além disso, o grupo CLP 48 horas não apresentou hiporreatividade à vasopressina, mas houve redução significativamente maior do fluxo sanguíneo renal em resposta à maior dose de vasopressina (60 pmol/kg) utilizada em nosso estudo, quando comparado ao grupo controle. Isso pode ser um indicativo de que o aumento de resposta do leito renal pode contribuir para a manutenção da resposta à vasopressina na PAM.

A avaliação da pressão arterial e do fluxo sanguíneo renal frente às administrações de diferentes doses de noradrenalina está representada na Figura 16. Podemos observar que apesar de não haver redução na resposta máxima induzida por doses de noradrenalina nos grupos CLP quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 16A), há redução na área sob a curva no grupo CLP 18 horas (Figura 16B). Quando observamos a redução do fluxo sanguíneo renal cortical frente às administrações de noradrenalina, não há diferença significativa entre os grupos experimentais (Figura 16C).





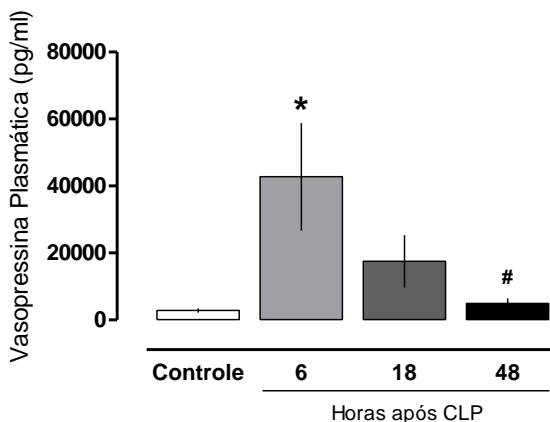
**Figura 15: Alteração na responsividade à vasopressina na pressão arterial e no fluxo sanguíneo renal de ratos sépticos.** Os efeitos pressores da vasopressina na PAM (A), AUC (B) e FSR (C) de ratos anestesiados foram avaliados 6, 18 e 48 horas após a indução de sepse pelo modelo CLP. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6$ , por grupo). Dados seguidos de \* são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) do respectivo controle (barras brancas). ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni.



**Figura 16: Alteração na responsividade à noradrenalina na pressão arterial e no fluxo sanguíneo renal de ratos sépticos.** Os efeitos pressores da noradrenalina na PAM (A), AUC (B) e FSR (C) de ratos anestesiados foram avaliados 6, 18 e 48 horas após a indução de sepse pelo modelo CLP. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 5-6$ , por grupo). Dados seguidos de \* são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) do respectivo controle (barras brancas). ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni.

### 5.2.3 Aumento da Vasopressina Plasmática e Manutenção nos Níveis de Creatinina, Ureia e Lactato Plasmáticos nos Animais CLP Quando Comparados aos Controle

Concomitante ao registro da pressão arterial e do fluxo vascular renal, amostras de sangue foram coletadas dos animais controle e CLP (grupos 6, 18 e 48 horas) e, após processamento, foram analisadas vasopressina, creatinina, ureia e lactato plasmático. Podemos observar na Figura 17 um aumento significativo dos níveis plasmáticos de vasopressina já nas primeiras horas após a indução de sepse por CLP (6 horas). Este aumento não foi mantido de forma significativa na 18ª hora, retornando a valores semelhantes ao controle na 48ª hora de análise.



**Figura 17: Aumento da vasopressina plasmática 6 horas após a indução de sepse por CLP.** A análise foi realizada em amostras de plasma de animais controle e em animais submetidos à CLP (tempos 6, 18 e 48 horas). Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=5$ ). Dados seguidos de \* são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) do controle (barra branca). Dados seguidos de # são diferentes significativamente do grupo CLP 6h. ANOVA de uma via seguida de Dunnett.

A avaliação de creatinina e ureia plasmáticas não mostraram-se alteradas ao longo dos tempos analisados (Tabela 5). Contudo, os níveis de lactato, parâmetro relacionado à oxigenação orgânica, mostraram-se elevados em todos os tempos de análise após CLP, porém de maneira não significativa, sugerindo uma possível perfusão orgânica inadequada durante a progressão da sepse.

**Tabela 5: Avaliação dos níveis de creatinina, ureia e lactato no plasma de animais do grupo controle e dos grupos CLP (6, 18 e 48 horas).**

	Controle	CLP 6 h	CLP 18 h	CLP 48 h
Creatinina (mg/dL)	0,44 ± 0,02	0,47 ± 0,05	0,43 ± 0,02	0,43 ± 0,02
Ureia (mg/dL)	0,44 ± 0,02	0,47 ± 0,05*	0,43 ± 0,02	0,43 ± 0,02
Lactato (mg/dL)	9,98 ± 1,62	19,13 ± 2,19	14 ± 1,01	20,98 ± 6,46

Amostras coletadas de animais anestesiados: controle e submetidos à CLP (tempos 6, 18 e 48 horas). Os valores foram expressos em média ± erro padrão da média (n de 5 a 6 por grupo). ANOVA de uma via.

#### 5.2.4 Avaliação, *in vitro*, da Reatividade à Vasopressina, à Fenilefrina e à Acetilcolina em Anéis de Aorta de Animais Controle e Submetidos à CLP

Após o período inicial de estabilização, os anéis de aorta foram testados quanto à viabilidade da preparação (solução despolarizante de KCl 120 mM) e presença de endotélio funcional, como detalhado anteriormente (item 4.7.2). A Tabela 6 mostra a contração inicial induzida por KCl e pela fenilefrina. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais quando comparados ao controle.

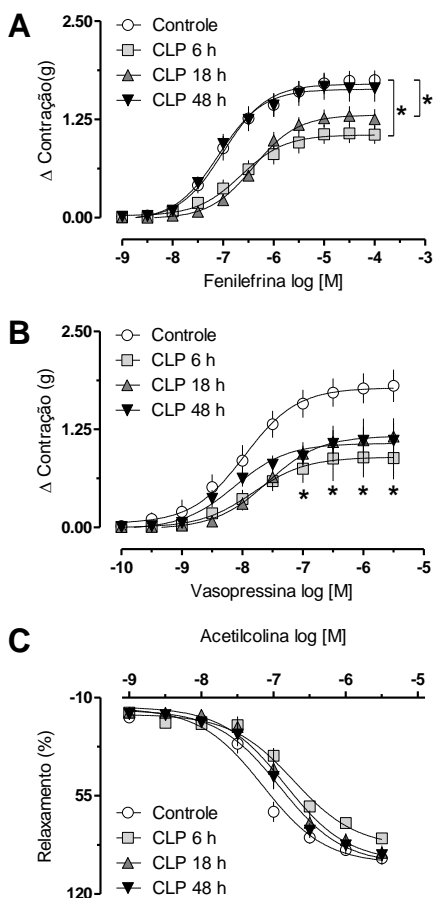
**Tabela 6: Resposta contrátil induzida por KCl e fenilefrina em anéis de aorta obtidos de animais controle e CLP.**

	KCl ( $\Delta$ em g)	Fenilefrina ( $\Delta$ em g)
Controle	1,848 $\pm$ 0,1970	1,495 $\pm$ 0,1390
CLP 6 h	1,349 $\pm$ 0,2694	0,9263 $\pm$ 0,1390
CLP 18 h	1,214 $\pm$ 0,1193	1,177 $\pm$ 0,08769
CLP 48 h	1,893 $\pm$ 0,2137	1,543 $\pm$ 0,1492

Anéis de aorta obtidos de animais controle ou submetidos à CLP (tempos 6, 18 e 48 horas). Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n de 5 a 6 por grupo). ANOVA de uma via.

Para avaliar se os efeitos pressóricos sistêmicos observados para vasopressina (Figura 15) e para noradrenalina (Figura 16) estavam relacionados ao efeito renal e não aos efeitos dos vasos de grande calibre, como a aorta, foram utilizados anéis de aorta isolados dos animais controle e CLP para avaliar a

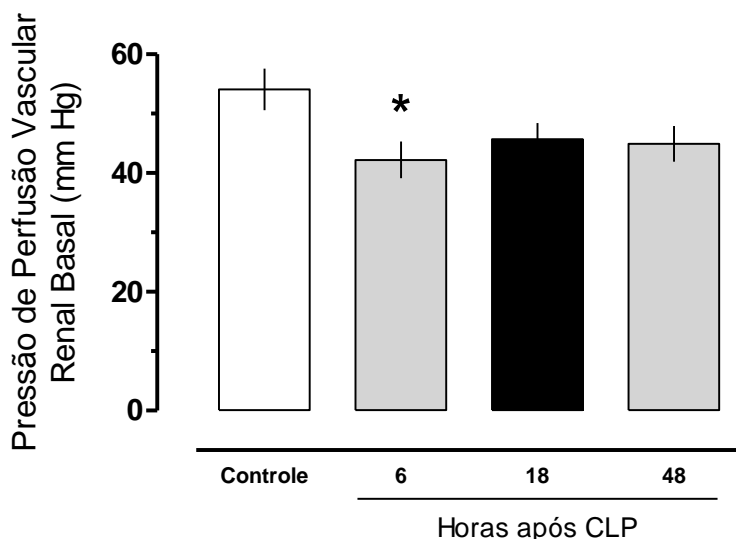
resposta contrátil à fenilefrina, à acetilcolina e à vasopressina. A Figura 18 mostra a resposta contrátil à fenilefrina (Figura 18A), à vasopressina (Figura 18B) e a resposta vasorelaxante da acetilcolina (Figura 18C) em anéis de aorta isolados de animais controle ou submetidos à CLP e avaliados 6, 18 e 48 horas após a cirurgia. Em A pode-se observar a redução da resposta máxima à fenilefrina nos grupos CLP 6 e 18 horas quando comparados ao grupo controle. Já a resposta contrátil induzida pela vasopressina (Figura 18B) mostrou-se reduzida, nas maiores concentrações, nos animais dos grupos CLP 6, 18 e 48 horas após a indução da sepse quando comparados ao grupo controle. Em C, não houve diferença entre os grupos experimentais avaliados para as preparações estimuladas com acetilcolina.



**Figura 18: Redução da resposta contrátil à fenilefrina e à vasopressina, mas não da resposta relaxante à acetilcolina, em anéis de aorta de animais CLP.** Em A, CCR para a fenilefrina; em B, CCR para a vasopressina; e em C, à acetilcolina, em aortas pré-contraídas com fenilefrina. Anéis de aorta obtidos de animais naïve ou submetidos à CLP e avaliados 6, 18 e 48 horas após indução de sepse. Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=4-6$ ). Dados seguidos de \* são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) do controle (círculos brancos). ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni.

### 5.2.5 Avaliação, *in vitro*, da Pressão de Perfusão Vascular Basal de Rins Obtidos de Animais Controle ou Submetidos à CLP

Após o período de estabilização das preparações, a pressão de perfusão vascular renal (PPVR) basal foi avaliada. Pode-se observar que há uma redução na PPVR basal nos animais do grupo CLP 6 horas (Figura 19). Essa redução parece ser mantida nos grupos mais tardios, porém estas não foram diferentes do grupo controle.



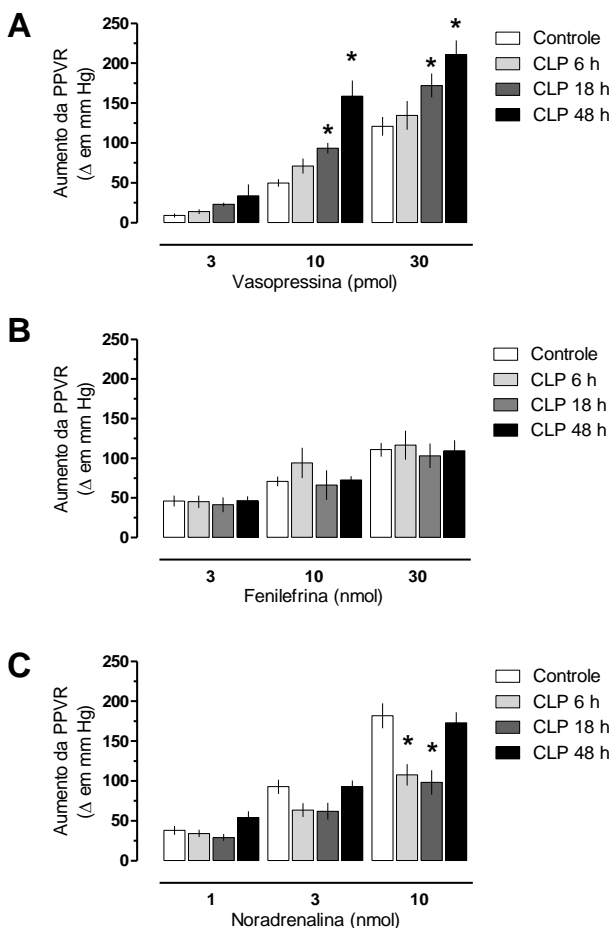
**Figura 19: Redução da pressão de perfusão vascular renal basal nos animais CLP 6 horas, mas não nos grupos CLP 18 e 48 horas.** Avaliação da PPRV basal dos animais naive ou submetidos à técnica de CLP. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=10$ ). Dados seguidos de \* são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) do controle (barra branca). ANOVA de uma via, seguida de Dunnett.



### *5.2.6 Avaliação, in vitro, da Reatividade Vascular Renal à Vasopressina, Noradrenalina, Fenilefrina e Acetilcolina em Preparações Obtidas de Animais Controle e CLP*

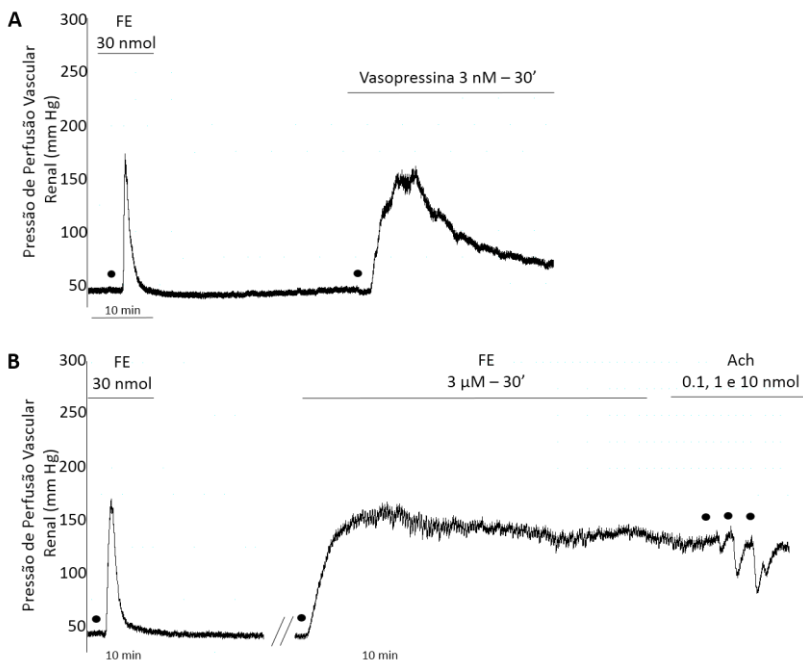
Visando avaliar a responsividade renal frente aos vasoconstritores clássicos usados na clínica para o tratamento da sepse, e ainda a função endotelial dos vasos do leito renal, após o período de estabilização e o teste de viabilidade com fenilefrina (dados não mostrados), foram realizadas curvas não cumulativas para a vasopressina (3, 10 e 30 pmol), fenilefrina (3, 10 e 30 nmol) e noradrenalina (1, 3 e 10 nmol).

É possível observar na Figura 20A que concentrações crescentes de vasopressina geram contração de maneira dependente da dose em todos os grupos experimentais avaliados. Além disso, os rins isolados dos animais submetidos à CLP e avaliados nos tempos 18 e 48 horas após o procedimento apresentam um aumento na responsividade a este vasoconstritor nas doses de 10 e 30 pmol. Já a avaliação da curva dose-resposta à fenilefrina não demonstrou qualquer alteração significativa entre os grupos experimentais avaliados (Figura 20B). Diferentemente da reatividade à vasopressina, os animais do grupo CLP 6 e 18 horas apresentaram uma redução na resposta à noradrenalina quando comparados ao grupo controle (Figura 20C). Estes dados nos revelam que o leito vascular renal se comporta diferente frente à vasoconstrição induzida pela vasopressina, fenilefrina e noradrenalina em animais sépticos, apesar de todos os fármacos testados ativarem vias de sinalização intracelulares similares quando atuantes em seus respectivos receptores.



**Figura 20: Alterações na reatividade vascular renal em resposta à vasopressina e à noradrenalina em preparações obtidas de animais controle ou submetidos à CLP. Efeito da adição não cumulativa de: em A, vasopressina (3, 10 e 30 pmol); em B, fenilefrina (3, 10 e 30 nmol); e em C, noradrenalina (1, 3 e 10 nmol). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Dados seguidos de \* apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos respectivos controles (barras brancas). ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni.**

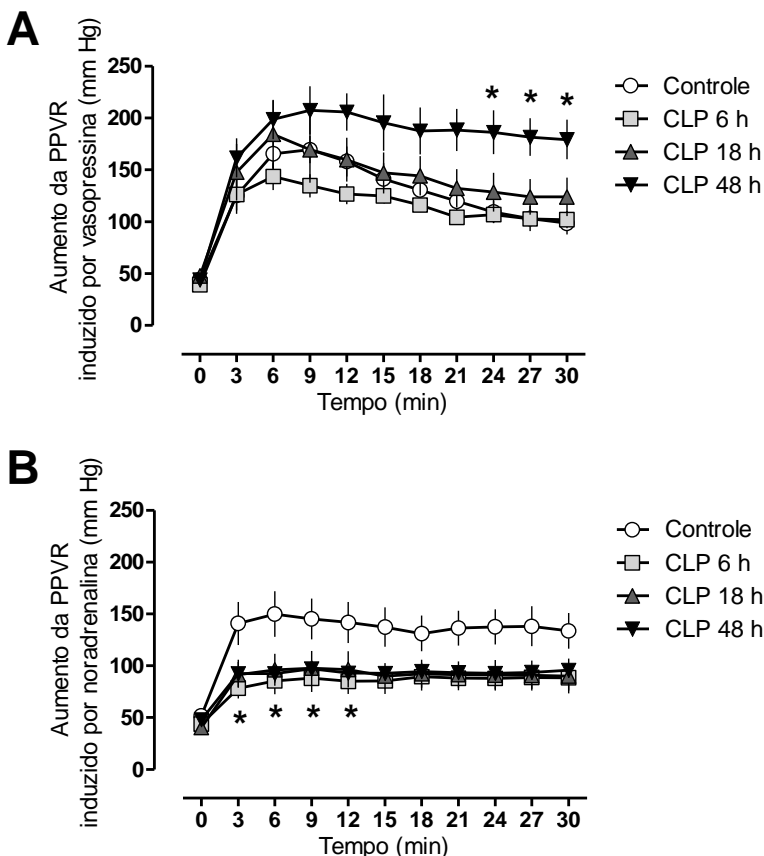
O próximo protocolo experimental avaliou a resposta à perfusão contínua destes mesmos vasoconstritores. Além disso, ao final de 30 minutos de perfusão renal com fenilefrina, foi realizada uma curva dose resposta para acetilcolina para avaliar a funcionalidade endotelial das preparações. O registro típico abaixo (Figura 21) ilustra este protocolo experimental.



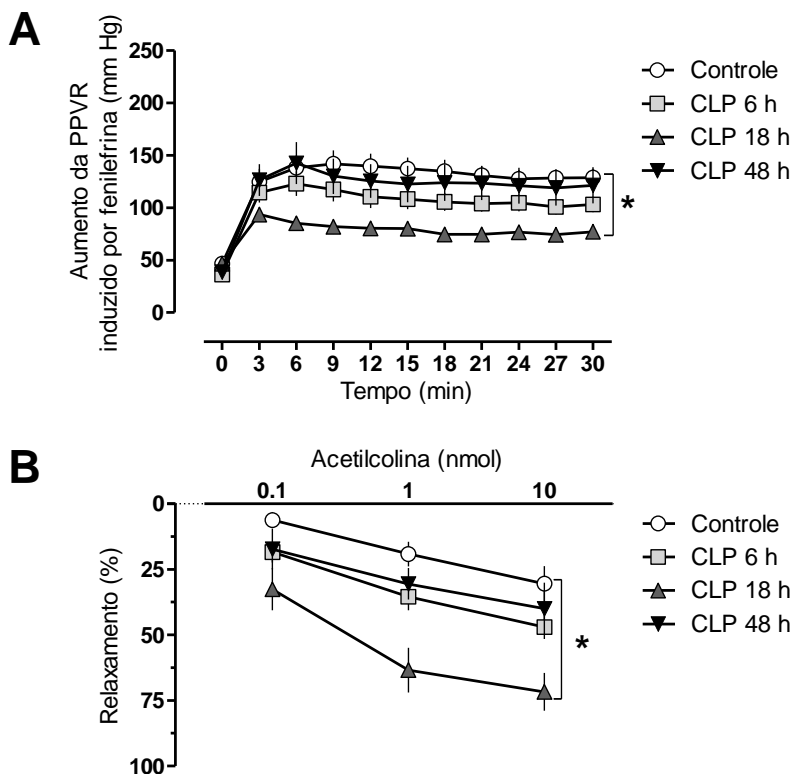
**Figura 21: Registros típicos dos experimentos que avaliaram o efeito da perfusão contínua de vasopressina, noradrenalina e fenilefrina e o efeito da curva dose-resposta para acetilcolina em rins de ratos controle.** Em A, registro típico do protocolo experimental de perfusão contínua de vasopressina (3 nM) e noradrenalina (1 μM) por 30 minutos. Em B, protocolo de perfusão contínua com fenilefrina seguida de curva concentração resposta simples para a acetilcolina (0,1, 1 e 10 nmol). Ambos os registros foram obtidos em rim isolado e perfundido de animais controle. Contudo, os experimentos foram realizados também nos animais submetidos à CLP (6, 18 e 48 horas).

O aumento da pressão de perfusão vascular renal induzido pela perfusão com vasopressina (3 nM) nos grupos CLP 6 e 18 horas foi similar ao grupo controle (Figura 22A). Porém, os rins retirados dos animais CLP 48 horas apresentaram um aumento na reatividade à vasopressina (dados similares aos observados nas administrações de doses crescentes mostradas na figura 21A). Contudo, na perfusão com noradrenalina, somente o grupo CLP 6 horas apresentou diferença significativa no início da perfusão (3 minutos) quando comparado aos diferentes tempos analisados no grupo controle (Figura 22B), apesar de uma redução não significativa ser observada ao longo dos 30 minutos avaliados e em todos os grupos CLP (6, 18 e 48 horas).

A resposta contrátil vascular renal também foi avaliada após perfusão continuada com fenilefrina. Pôde-se observar na Figura 23A que somente o grupo CLP 18 horas (triângulo cinza) apresentou uma redução da resposta de perfusão vascular renal quando comparada ao grupo controle (círculos brancos). Além dessa redução, o grupo CLP 18 horas também foi o único que apresentou um aumento da reatividade à acetilcolina (Figura 23B) nas preparações pré-contraídas com fenilefrina (3  $\mu$ M).



**Figura 22: Aumento da pressão de perfusão vascular renal à vasopressina em animais CLP 48 horas.** Rins obtidos de ratos controle ou sépticos (6, 18 e 48 horas). Em A, efeito da perfusão com PSS contendo vasopressina (AVP, 3 nM) e, em B, PSS contendo noradrenalina (Nor 1  $\mu$ M). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Dados seguidos de \* apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle (círculos brancos). ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni.

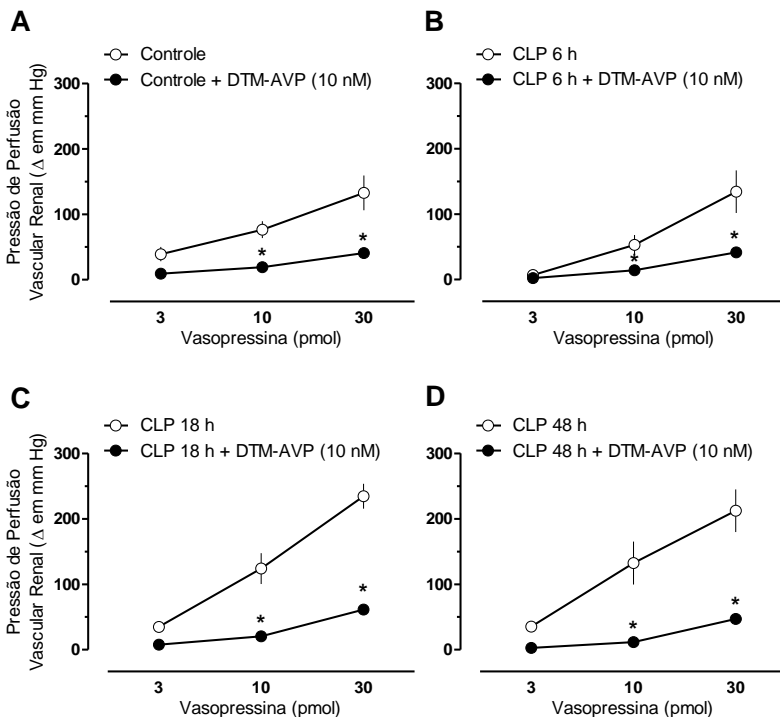


**Figura 23: Redução no aumento da pressão de perfusão vascular renal induzida pela fenilefrina e aumento da resposta frente à acetilcolina em animais CLP 18 horas.** Rins obtidos de ratos controle ou sépticos (6, 18 e 48 horas). Em A, efeito da perfusão com PSS contendo fenilefrina (FE, 3  $\mu$ M); e em B, redução da PPVR gerada pela acetilcolina, em forma de curva não cumulativa, cujas preparações foram previamente perfundidas com FE. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Dados seguidos de \* apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle (círculos brancos). ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni.

### **5.3 Parte 3: Investigação dos Mecanismos Intracelulares Envolvidos na Manutenção e no Aumento da Reatividade Vascular Renal à Vasopressina em Animais CLP**

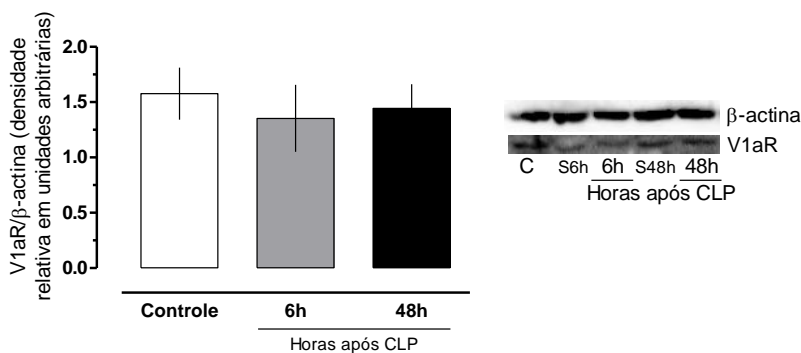
#### *5.3.1 Aumento da Reatividade à Vasopressina Não é Mediado Por Alteração na Funcionalidade e na Densidade de Receptores em Rins Isolados de Animais Sépticos*

Para avaliar a participação dos receptores V1a no aumento da reatividade à vasopressina em animais CLP foram realizados dois protocolos experimentais. O primeiro foi desenvolvido utilizando a metodologia de rim isolado e perfundido, no qual duas curvas dose-resposta para vasopressina (3, 10 e 30 pmol) foram realizadas: a primeira antes e a segunda na presença do antagonista de receptor V1a (DTM-AVP 10 nM). Pôde-se observar após a perfusão do leito com DTM-AVP a redução significativa da resposta contrátil induzida pela vasopressina em todos os grupos experimentais (Figura 24), sendo essa redução maior nos grupos CLP 18 e 48 horas (Figuras 24C e 24D). Contudo, mesmo com essa redução aumentada nestes grupos, a resposta final da vasopressina ficou igual em todos os grupos experimentais quando comparados. Estes dados indicam que o mecanismo envolvido no aumento da resposta à vasopressina nos animais CLP 18 e 48 horas pode estar em parte relacionado à diferença na atividade dos receptores V1a. Em seguida, foi realizado um segundo protocolo no qual a densidade de receptores V1a foi investigada por imunoeletroforese (Figura 25). No entanto, não houve diferença significativa na expressão dos receptores V1a nos grupos avaliados, sugerindo que o mecanismo pelo qual a vasopressina tem sua reatividade potencializada não está ligado as alterações na expressão total deste subtipo de receptor. Também foi investigada a expressão do receptor V2 e não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais avaliados (dados não mostrados).



**Figura 24: Redução no efeito vasoconstritor da vasopressina na pressão de perfusão vascular renal em rins obtidos de animais controle e CLP (6, 18 e 48 horas) após perfusão com um antagonista de receptor V1a.** Curva concentração resposta não cumulativa para a vasopressina em leitos perfundidos com veículo (PSS) ou DTM-AVP (10 nM) de rins obtidos de animais: em A, controle; em B, CLP 6 horas; em C, CLP 18 horas; e em D, CLP 48 horas. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Dados seguidos de \* apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle (círculos brancos). ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni.



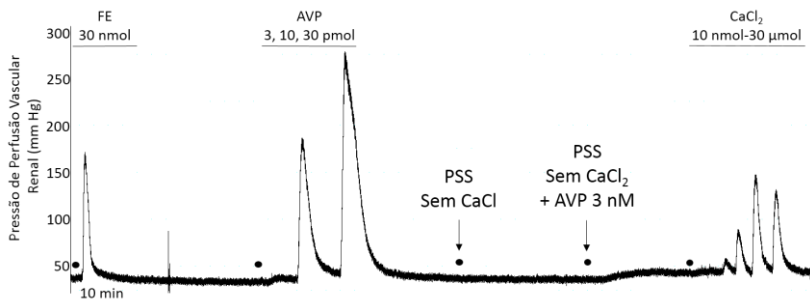


**Figura 25: Expressão e representação de imunoelctroforese do receptor V1a em córtex renal obtidos de ratos controle ou de animais submetidos à CLP 6 e 48 horas.** Amostras de córtex renal obtida de animais controle, animais falso operados (S6h e S48h) e animais submetidos à CLP e avaliados 6 e 48 horas após a indução de sepse. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n=4 animais por grupo). ANOVA de uma via.

### 5.3.2 Redução na Mobilização de Cálcio Intracelular Pela Vasopressina em Animais CLP 48 Horas

Investigamos a participação do cálcio intracelular, principalmente o cálcio liberado pelo retículo sarcoplasmático, e o envolvimento dos canais de cálcio da membrana plasmática no aumento da reatividade vascular renal à vasopressina através do protocolo mostrado no registro obtido da preparação de rim isolado e perfundido (Figura 26). Este é um registro típico de um rim isolado e perfundido do animal do grupo CLP 48 horas. Nesta figura é possível notar a reatividade vascular renal induzida pela vasopressina (curva dose-resposta não cumulativa 3, 10 e 30 pmol), além do aumento da pressão de perfusão vascular renal induzida pela perfusão contínua de vasopressina (3 nM) na

ausência do cálcio. Também é possível notar que quando foi realizada a curva para o cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) no terço final do protocolo experimental, este foi capaz de restaurar a reatividade à vasopressina no grupo CLP 48 horas.



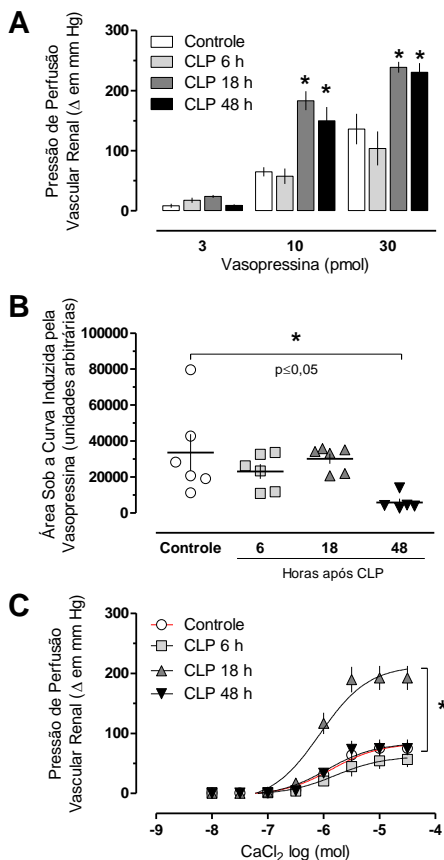
**Figura 26: Registro típico do experimento que avaliou a participação do cálcio intracelular na resposta contrátil da vasopressina em rim isolado e perfundido.** Registro típico observado em rim isolado de um animal submetido à CLP e analisado 48 horas após. Um período de estabilização de 60 minutos foi respeitado antes do início do protocolo experimental. Após administração de fenilefrina (30 nmol) e da curva dose-resposta de vasopressina (3, 10 e 30 pmol), um novo período de 15 minutos foi respeitado. Os rins foram então perfundidos com solução nutritiva similar à PSS já descrita, mas sem a presença de  $\text{CaCl}_2$  por 15 minutos. Após esse período, foi adicionado a esse líquido vasopressina (concentração final de 3 nM) e, após mais 20 minutos de perfusão, uma curva de doses não cumulativas de  $\text{CaCl}_2$  (10 nmol a 30  $\mu\text{mol}$ ) foi realizada.

A Figura 27A reforça os achados prévios demonstrados no item 5.2.6 quanto ao aumento da reatividade à vasopressina nos rins isolados de animais CLP 18 e 48 horas. Houve diferença significativa nestes grupos quando comparados ao grupo controle nas maiores doses de vasopressina administradas (10 e 30 pmol). A figura 27B mostra a vasoconstrição renal induzida pela perfusão continua de vasopressina na ausência de cálcio extracelular. Pode-se observar que nos animais do grupo CLP 48 horas a

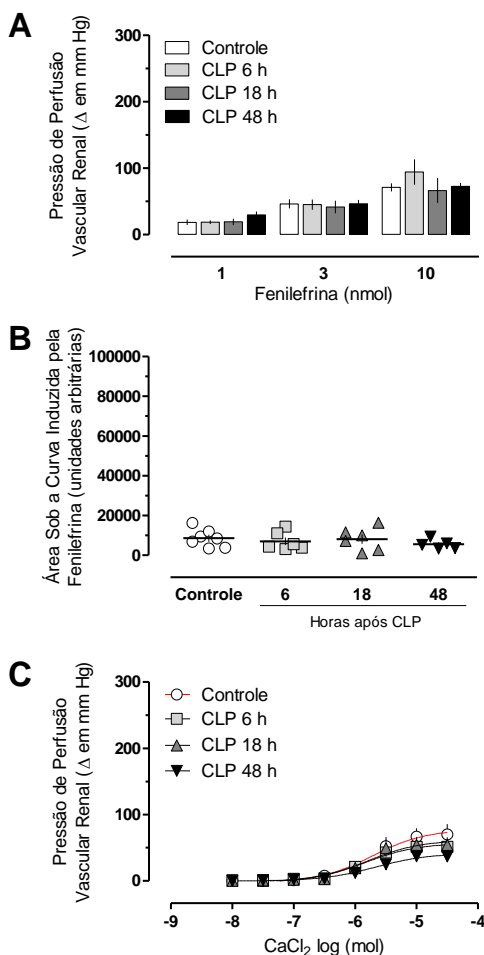
resposta à AVP foi reduzida quando comparada à resposta contrátil obtida do leito vascular renal dos animais do grupo controle. Ao final do protocolo experimental foi avaliado o aumento da pressão de perfusão induzido pela vasopressina (3 nM) e na ausência de cálcio intracelular, através de administrações não cumulativas e crescentes de  $\text{CaCl}_2$  (10 nmol a 30  $\mu\text{mol}$ ). Não houve diferença neste aumento da PPVR induzido pela vasopressina nos animais dos grupos CLP 6 e 48 horas quando comparados aos animais controle (Figura 27C). Contudo, o grupo 18 horas apresentou um aumento na resposta à vasopressina após a CCR de  $\text{CaCl}_2$ , sugerindo que neste tempo avaliado pode haver a participação de alguns canais de cálcio de membrana, alterando a mobilização intracelular de cálcio, que auxiliam na hiper-reatividade à vasopressina.

Após investigarmos a participação da mobilização de cálcio no retículo sarcoplasmático induzida pela vasopressina, foi avaliado se este efeito também poderia estar presente na resposta contrátil induzida pela fenilefrina após a indução de sepse. Estes dados serviram como um controle para os experimentos com a vasopressina, visto que estes mesmos animais dos grupos CLP 18 horas e CLP 48 horas não apresentaram hiper-reatividade à fenilefrina (dados mostrados na Figura 21B).

Podemos observar na Figura 28A que não há alteração na reatividade à fenilefrina (curva concentração-resposta não cumulativa) nos rins obtidos de animais CLP quando comparados ao grupo controle (barras brancas). A mobilização de cálcio do retículo sarcoplasmático está demonstrada na Figura 28B, através da realização de um protocolo experimental livre de cálcio no meio extracelular. Não houve diferença significativa na resposta contrátil induzida pela fenilefrina no leito vascular renal dos animais CLP. Além disso, a curva realizada com  $\text{CaCl}_2$  (Figura 28C) também não foi significativamente diferente entre os grupos avaliados.

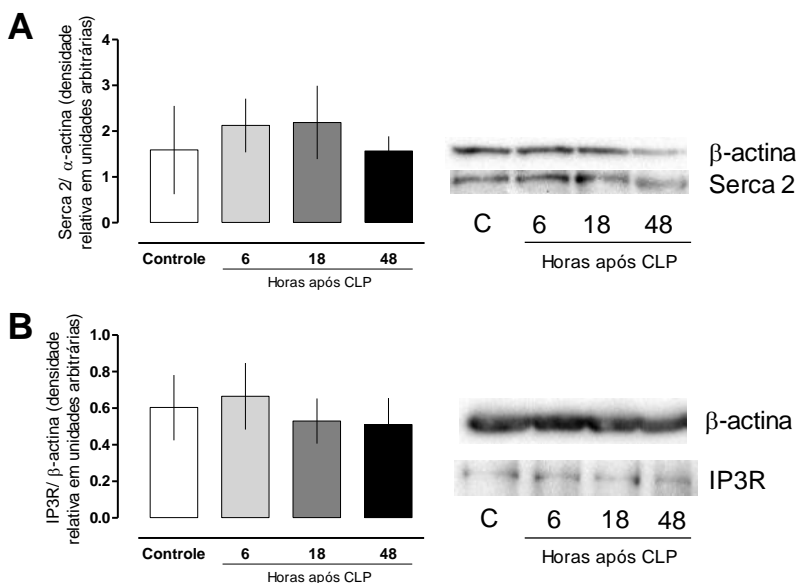


**Figura 27: Envolvimento da via do cálcio no aumento da reatividade à vasopressina no grupo CLP 48 horas mas não 18 horas após indução de sepse.** Avaliação da pressão de perfusão vascular renal de animais controle ou submetidos à CLP (6, 18 e 48 horas). Em A, CCR para a vasopressina em PSS normal; em B, área sob a curva da reatividade à vasopressina em PSS sem cálcio; e em C, CCR para  $\text{CaCl}_2$  em PSS sem cálcio contendo AVP (3 nM). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Dados seguidos de \* apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle (barras ou círculos brancos). ANOVA de uma via, seguida de Dunnet (B) e ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni (A e C).



**Figura 28: Manutenção da reatividade à fenilefrina na presença e na ausência do cálcio.** Avaliação da pressão de perfusão vascular renal de animais controle ou submetidos à CLP (6, 18 e 48 horas). Em A, CCR para a fenilefrina; em B, área sob a curva da reatividade à fenilefrina na ausência de cálcio extracelular; e em C, CCR para  $\text{CaCl}_2$  na presença de fenilefrina. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n de 5 a 7 animais por grupo). ANOVA de uma via (B) e ANOVA de duas vias (A e C).

Além da investigação *in vitro* utilizando leito vascular renal, também foram realizadas imunoeletroforeses para investigar a expressão das proteínas Serca 2 e do receptor de IP3 (Figura 29). Pode-se observar que não houve diferença significativa na expressão da bomba Serca 2 (Figura 29A) e na expressão do receptor de IP3 (Figura 29B) nos grupos CLP quando comparados ao grupo controle.

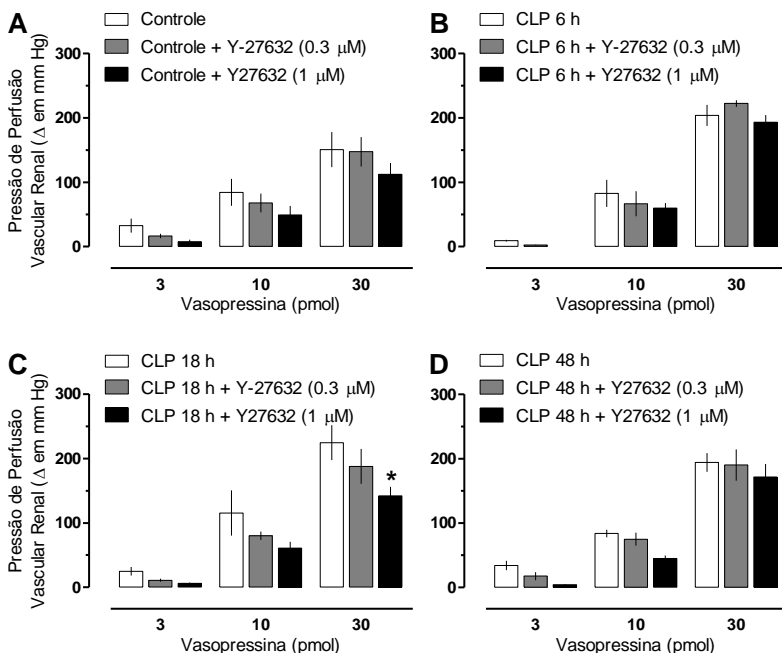


**Figura 29: Expressões e respectivas representações de imunoeletroforese da bomba de cálcio Serca 2 e do receptor de IP3 em córtex renal obtidos de ratos controle ou de animais submetidos à CLP.** Amostras de córtex renal obtidas de animais controle e animais submetidos à CLP e avaliados 6, 18 e 48 horas após a indução de sepse. Em A, expressão da bomba Serca 2; e em B, expressão de receptor IP3. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n=5 animais por grupo). ANOVA de uma via.

### *5.3.3 Participação da via Rho-A/Rho-quinase no Aumento da Reatividade à Vasopressina em Animais CLP*

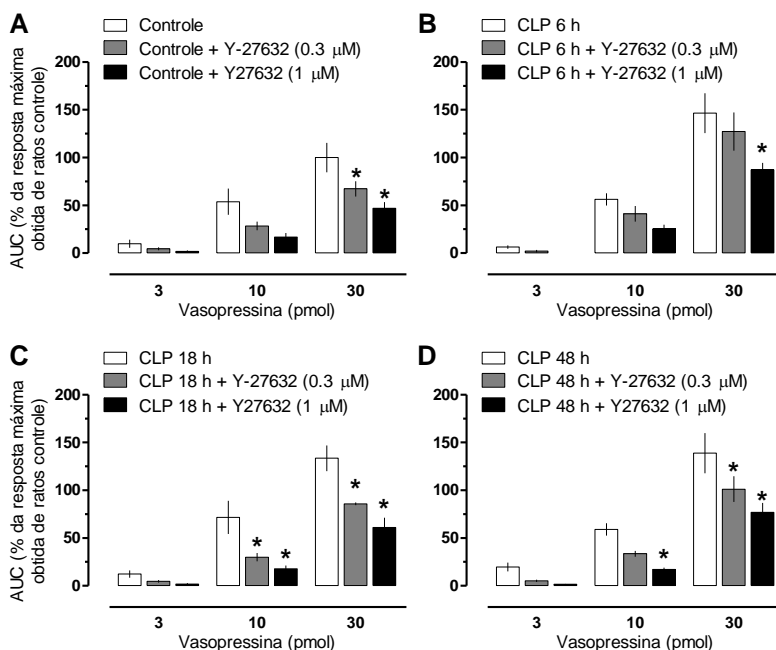
A fim de avaliar a participação da via Rho-A/Rho-quinase no aumento da reatividade vascular renal à vasopressina, após estabilização, foram realizadas duas curvas não cumulativas para vasopressina (nas doses de 3, 10 e 30 pmol): uma na ausência e outra na presença do composto Y-27632, um inibidor da enzima Rho-quinase, em duas concentrações diferentes (0,3 ou 1  $\mu$ M). A Figura 30 mostra que somente o grupo CLP 18 horas e somente na maior dose de vasopressina (30 pmol), o aumento na pressão de perfusão vascular renal foi significativamente menor quando comparado à mesma dose de AVP na ausência do composto Y-27632 (Figura 30C, barras brancas).

Além da influência da inibição da via Rho-A/Rho-quinase no aumento da pressão de perfusão vascular renal induzido pela vasopressina, a área sob a curva obtida dos registros típicos das preparações de rim isolado também foi avaliada. Pôde-se observar na Figura 31 que a maior dose de composto Y-27632 foi capaz de reduzir a AUC da resposta à vasopressina (30 pmol) em todos os grupos experimentais (em A, controle; em B, CLP 6h; em C, CLP 18 horas; e em D, CLP 48 horas). Contudo, somente no grupo CLP 18 horas é que ambas as doses de Y-27632 (0,3 e 1  $\mu$ M) foram capazes de reduzir a área sob a curva nas doses de 10 e 30 pmol de vasopressina (Figura 31C).



**Figura 30: Redução da reatividade à vasopressina induzida pela inibição da enzima Rho-quinase em leito vascular renal obtidos de animais do grupo CLP 18 horas.** Os gráficos mostram o aumento da pressão de perfusão vascular renal induzido pela vasopressina antes (barras brancas) e após a inibição da enzima ROCK pelo composto Y-27632 (0,3  $\mu$ M, barras cinzas; e 1  $\mu$ M barras pretas). Em A, rins obtidos de animais controle; em B, de animais CLP 6 horas; em C, de animais CLP 18 horas; e em D, de animais CLP 48 horas. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=5). Barras com \* são significativamente diferentes dos seus respectivos controles (barras brancas), com significância menor que 0,05. ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni.

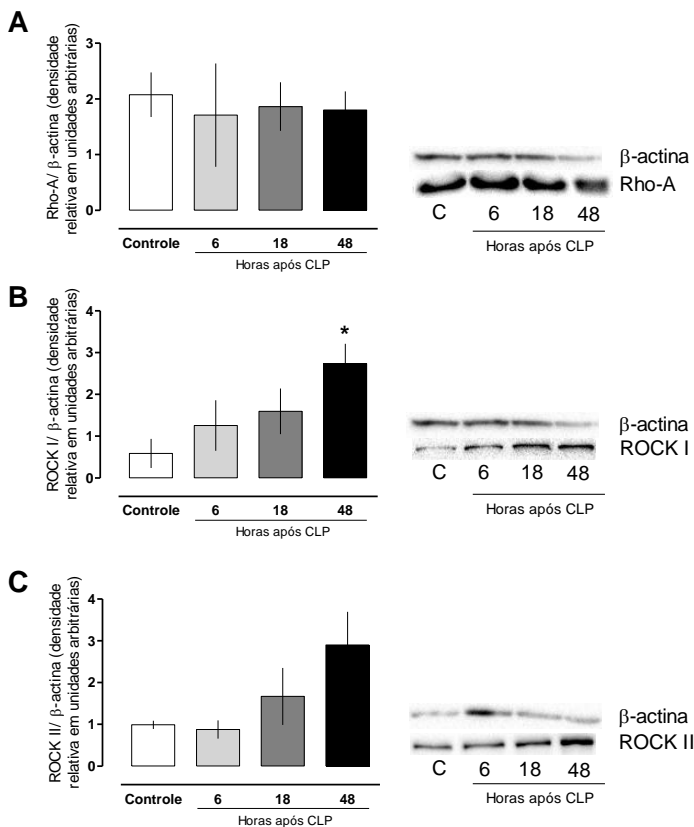




**Figura 31: Redução da reatividade à vasopressina, expressa em área sob a curva, induzida pela inibição da enzima Rho-quinase em leito vascular renal obtidos de animais do grupo controle e grupos CLP.** Os gráficos mostram a avaliação da área sob a curva a partir do aumento da pressão de perfusão renal induzida pela vasopressina antes (barras brancas) e após a inibição da enzima ROCK pelo composto Y-27632 (0,3  $\mu$ M, barras cinzas; e 1  $\mu$ M barras pretas). Em A, rins obtidos de animais controle; em B, de animais CLP 6 horas; em C, de animais CLP 18 horas; e em D, de animais CLP 48 horas. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=5). Barras com \* são significativamente diferentes dos seus respectivos controles (barras brancas), com significância menor que 0,05. ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni.

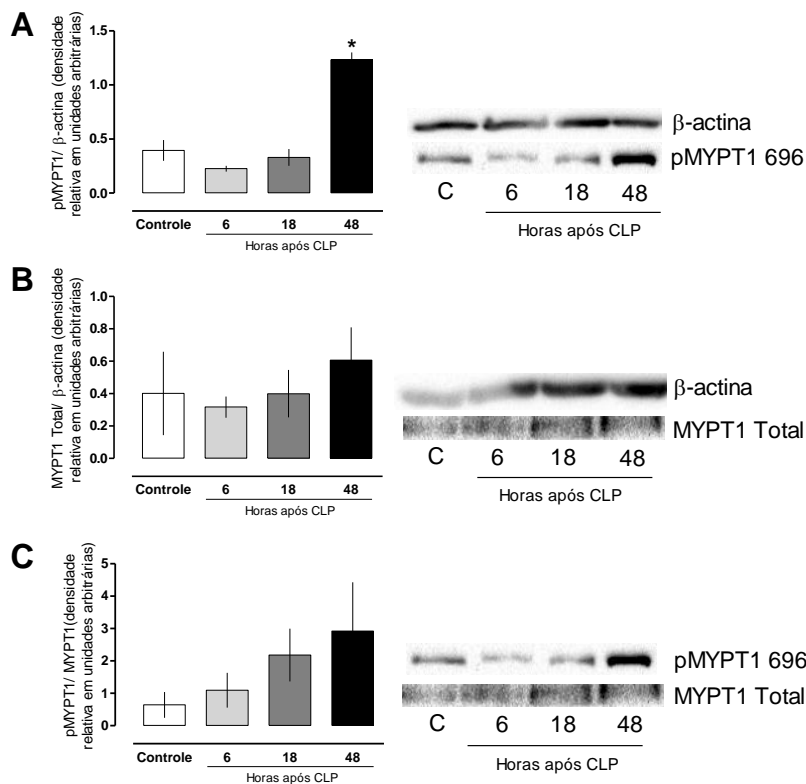
A análise da expressão das proteínas Rho-A, ROCK I e ROCK II por western blot estão mostradas na Figura 32. Pôde-se observar um aumento na expressão de ROCK I no grupo CLP 48

horas (Figura 32B) mas não das demais proteínas, mostrando uma possível participação desta via na hiper-reatividade à vasopressina nos animais CLP 48 horas.



**Figura 32: Expressões e representações de imunoelctroforese da proteína Rho-A e seu alvo ROCK (I e II) em córtex renal obtidos de ratos controle ou submetidos à CLP.** Amostras de córtex renal obtidas de rins de ratos controle ou submetidos à CLP e avaliados 6, 18 e 48 horas após. Em A, expressão de Rho-A; em B, de ROCK I; e em C, de ROCK II. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 4-5$ , por grupo). Dados seguidos de \* apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle. ANOVA de uma via, seguida de Dunnett.

Além disso, não foi observada diferença significativa na expressão da MYPT1 total (Figura 33B) entre os grupos avaliados. Contudo, a forma fosforilada no resíduo treonina 696 desta mesma proteína (pMYPT1) mostrou-se aumentada no grupo CLP 48 horas (Figura 33A), mostrando uma atividade desta proteína mais intensa quando comparada à atividade mostrada no grupo controle. A Figura 33C mostra a expressão da pMYPT1 em relação à expressão da MYPT1 total. Nota-se uma tendência ao aumento dessa relação ao longo da progressão do choque séptico (fase inicial, 6 horas; intermediária, 18 horas; e tardia, 48 horas).



**Figura 33: Expressões e respectivas representações de imunoeletroforese da proteína MYPT-1 fosforilada (resíduo Thr 696) e da MYPT1 total em córtex renal obtidos de ratos controle ou de animais submetidos à CLP. As amostras do córtex renal foram obtidas de rins de ratos controle ou submetidos ao modelo de CLP e avaliados 6, 18 e 48 horas após a indução de sepse. Em A, MYPT-1 fosforilada no resíduo treonina 696; e em B, MYPT-1 total; e em C, MYPT1 fosforilada pela MYPT1 total. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n = 5, por grupo). ANOVA de uma via, seguida de Dunnett.**

## 6. Discussão

Modelos animais ainda são indispensáveis na busca da compreensão acerca da progressão de diversas patologias que acometem o ser humano. Não podemos ignorar as diferenças existentes entre os modelos animais existentes e a condição que acomete o ser humano. Contudo, todo modelo, apesar das limitações, possui características que nos permitem transpor algumas semelhanças entre os estudos pré-clínicos e o que de fato ocorre na clínica.

Apesar da sepse ser uma das condições clínicas mais divergentes, o que dificulta seu detalhamento e estudos básicos e clínicos, diferentes modelos animais têm sido desenvolvidos e utilizados. Eles podem ser divididos em três modelos experimentais principais: (i) administração de toxinas exógenas, como a endotoxemia por administração de lipopolissacarídeo (LPS); (ii) administração de patógenos viáveis, como vírus e bactérias vivas; e (iii) alteração da barreira protetora endógena dos animais, como por exemplo o modelo de ligadura e perfuração do ceco (DEJAGER *et al.*, 2011).

O modelo considerado padrão ouro para o estudo da sepse é a CLP (RITTIRSCH *et al.*, 2009). Este modelo vem sendo utilizado há mais de 30 anos e representa, de maneira mais completa, a complexidade que envolve a progressão da sepse em humanos. Assim como a sepse humana, o CLP induz a disseminação bacteriana na corrente sanguínea através da instauração de um foco infeccioso local, culminando na inflamação sistêmica. As vantagens deste modelo envolvem o baixo custo, a presença de um amplo espectro de bactérias, ou seja, um modelo polimicrobial, e ainda a progressão similar à sepse humana com a ativação gradual de células do sistema imunológico e a produção, em fases, de citocinas pró e anti-inflamatórias (para uma revisão detalhada ver BURAS *et al.*, 2005; HUBBARD *et al.*, 2005; e DEJAGER *et al.*, 2011). Além disso, as alterações

cardiovasculares induzidas por esse modelo já estão bem descritas na literatura (CLOWES *et al.*, 1968; JI *et al.*, 1996; GONÇALVES *et al.*, 2014; ABDELRAHMAN *et al.*, 2015), sendo este um dos motivos pelo qual este modelo foi escolhido para a realização deste trabalho.

A primeira parte deste trabalho visou demonstrar as alterações cardiovasculares, hematológicas e renais promovidas pela ligadura e perfuração do ceco a fim de correlacionar as mudanças promovidas por este modelo com os achados clínicos já bem caracterizados em humanos. Nós demonstramos que a partir da sexta hora após a indução de sepse, os animais já apresentavam sinais clínicos de infecção, como a elevação da temperatura. Além disso, neste mesmo tempo analisado, os animais do grupo CLP já estavam hipotensos e com aumento da frequência cardíaca, complicações que foram mantidas até a 48ª hora de análise. Nós também mostramos que na 48ª hora após a indução da sepse 50% dos animais já haviam morrido. Nosso trabalho também mostrou um aumento significativo nos metabólitos do NO no plasma de animais sépticos, assim como redução plaquetária e linfocitária.

É sabido que a sepse compromete uma série de sistemas orgânicos durante sua progressão para sepse severa e choque séptico. Em nosso grupo, utilizando o mesmo modelo e severidade de sepse, Gonçalves (2014) mostrou uma redução significativa na pressão arterial sistêmica e uma redução de parâmetros de contratilidade sistólica e diastólica ( $dP/dt$  máximo e  $dP/dt$  mínimo, respectivamente) 48 horas após a indução de sepse, assim como um aumento da frequência cardíaca (grupo CLP 24 horas). Além disso, diversos trabalhos associam a redução da pressão arterial não só ao comprometimento cardíaco, mas principalmente ao excesso de NO produzido durante a sepse. Desde o início da década de 80 sabe-se do papel fundamental do NO na manutenção do tônus do músculo liso vascular. Trabalhos do grupo de Murad (1977), Furchgott e Zawadzki (1980) e Ignarro *et*

*al* (1987) deram embasamento em tudo o que se sabe hoje sobre o NO. Além disso, o excesso na produção de NO já está bem descrito na sepse. Em 1990, Kilbourn *et al.* demonstraram que a hipotensão existente no choque séptico é decorrente do excesso de NO produzido durante esta condição. Meyer *et al.* (1994) mostraram uma melhora no quadro hiperdinâmico associado à sepse após inibição da óxido nítrico sintase, e até propuseram esta inibição como possível ferramenta farmacológica no tratamento da sepse. No entanto, estudos subsequentes revelaram que a inibição da síntese de NO causava piora nas taxas de mortalidade associadas à sepse, tanto em pacientes quanto em modelos experimentais (WRIGHT, REES & MONCADA, 1992; PETROS, BENNETT & VALLENCE, 1991), mostrando que, além da participação fundamental do NO no combate à inflamação, outras vias modulatórias do sistema vascular poderiam contribuir para o mal prognóstico da sepse.

Diversos estudos revelaram que as alterações cardiovasculares descritas anteriormente são acompanhadas de acometimentos da função renal, caracterizadas pela acidificação da urina, redução do débito urinário, além da excreção reduzida dos íons sódio e potássio e do metabólito ureia. As alterações renais induzidas pela CLP demonstradas neste estudo vão ao encontro do comprometimento renal também encontrado no trabalho realizado por da Rosa Maggi Sant Helena (2015), que demonstrou que após 18 horas da indução de sepse pelo modelo CLP houve redução no volume urinário associada à redução na excreção de potássio urinário. Além disso, também foi demonstrado o aumento significativo da resistência vascular renal associada à redução do fluxo sanguíneo renal neste mesmo período pós-sepse (18 horas). Estes achados já foram descritos em pacientes que desenvolveram insuficiência renal aguda (IRA) *per se* (LOPES & JORGE 2013), ou em decorrência da sepse grave (PLATAKI *et al.*, 2011), mostrando que a CLP pode ser um bom modelo para estudar a disfunção renal promovida durante a progressão da sepse. Apesar de não termos realizado aferições

de resistência e fluxo renal, é notório que as alterações descritas em nosso estudo podem ser decorrentes de mudanças de fluxo e resistência renal, uma vez que estes parâmetros revelam um comprometimento da manutenção de tônus vascular renal subsequente à redução na pressão arterial sistêmica (para revisão detalhada ver REGUEIRA *et al.*, 2011).

As disfunções orgânicas que ocorrem com o agravamento da sepse estão diretamente relacionadas aos altos índices de mortalidade associados a esta condição. Nosso estudo pôde fazer esta correlação visto que a maior porcentagem de mortalidade ocorreu concomitantemente às principais alterações cardíacas, renais e hematológicas. Esta primeira parte do estudo nos possibilitou a escolha de 4 grupos experimentais distintos, de acordo com os próximos objetivos específicos: um grupo controle (animais naive), e 3 diferentes grupos sépticos, de acordo com o tempo de análise (6, 18 e 48 horas após a indução de sepse por CLP).

O baixo desempenho obtido durante o tratamento da sepse levou, no início da década de 80, à introdução de novos agentes de ação vasoconstritora. Foi neste contexto que surgiram os primeiros estudos acerca do potencial efeito da vasopressina endógena e também da administração de vasopressina exógena como alternativa às catecolaminas. A segunda parte deste trabalho objetivou o estudo do perfil de liberação de vasopressina endógena, assim como o efeito sistêmico e renal deste agente frente à progressão do choque séptico.

Em animais anestesiados, os valores basais da pressão arterial média, frequência cardíaca e fluxo sanguíneo renal mostraram-se inalteradas nos animais dos grupos CLP (6, 18 e 48 horas) quando comparada ao controle. Estes dados não corroboram com os obtidos utilizando a técnica de pletismografia de cauda (Figura 8). No entanto, isso pode ser explicado pela hipotensão causada pelo processo anestésico, ao qual todos os animais foram submetidos. Contudo, para mostrar a



hiporresponsividade às catecolaminas, condição já bem descrita na literatura, foi avaliada a resposta frente à administração de uma única dose de fenilefrina, e esta mostrou-se menor nos grupos CLP 18 e 48 horas. A hiporreatividade às catecolaminas no choque séptico parece ser causada por uma associação de mudanças decorrentes desta patologia, incluindo, mas não se limitando, a dessensibilização de receptores adrenérgicos devido à liberação exacerbada de agentes vasoativos nos estágios iniciais da sepse (THIEMERMANN *et al.* 1993; MATSUDA *et al.*, 2000; BUCHER, HOBBAHN & KURTZ, 2001), o aumento da produção e liberação de NO produzido pela isoforma induzível (HOLLENBERG *et al.*, 2000; KIN & GREENBURG, 2002); e a abertura de canais para potássio (DA SILVA-SANTOS & ASSREUY, 1999; DA SILVA-SANTOS, 2003).

Alguns estudos têm relatado perda ou manutenção de reatividade à vasopressina em estágios pontuais da sepse, sem no entanto, detalhar este perfil de resposta durante diferentes estágios desta condição clínica (LEONE & BOYLE, 2006). O perfil de hiporreatividade foi encontrado em anéis de aorta, os quais em todos os tempos avaliados após CLP apresentaram redução da resposta vasoconstritora à vasopressina. Porém, nossos experimentos utilizando animais anestesiados revelaram uma redução na resposta pressórica à AVP nos estágios iniciais da sepse (6 e 18 horas), acompanhada do retorno aos níveis semelhantes ao encontrado no grupo controle no estágio tardio da sepse (grupo 48 horas). Simultaneamente, a avaliação do fluxo sanguíneo renal frente à administração de vasopressina mostrou a redução significativamente maior somente no grupo CLP 48 horas quando comparada ao controle. Além disso, a concentração da vasopressina plasmática mostrou-se elevada, em aproximadamente 8 vezes, na 6ª hora após a CLP com retorno aos níveis basais no tempo de 48 horas.

É notório observar a relação direta entre os níveis elevados de AVP plasmático e a hiporreatividade à vasopressina. Estas

oscilações nos níveis de vasopressina observadas durante a progressão do choque séptico já foram descritas tanto experimentalmente (BRACKETT *et al.*, 1985) quanto em pacientes sépticos (SHARSHAR *et al.*, 2003). É sabido que a redução da pressão arterial e a hipovolemia são potentes estímulos para a liberação de vasopressina, na tentativa do organismo de restaurar a resistência vascular sistêmica e também a pressão arterial. Porém, esta estimulação constante causa depleção na produção e liberação deste agente vasoconstritor (SCHALLER *et al.*, 1985; WALL *et al.*, 1994). Este parece ser o principal motivo pelo qual ocorre este pulso inicial seguido de redução nos níveis de AVP plasmáticos durante a sepse experimental e clínica. Além disso, é possível existir uma relação direta entre estas oscilações e a redução da resposta pressórica à vasopressina, visto que já é bem descrito na literatura a dessensibilização de receptores V1a (acoplados à proteína G) em altas concentrações de ligante e por tempo de exposição prolongadas (INNAMORATI, SADEGHI & BIRNBAUMER 1998).

Quando comparado aos efeitos pressóricos da vasopressina, a noradrenalina causou um aumento da pressão arterial maior nos animais do grupo controle, com uma hiporreatividade no grupo CLP 18 horas. A redução do fluxo sanguíneo renal induzida pela noradrenalina não se mostrou diferente nos grupos CLP quando comparados ao controle. Quando observamos as diretrizes propostas pelo último guia de sobrevivência da sepse, publicado em 2013, Dellinger e colaboradores relatam que baixas doses de noradrenalina associadas aos outros agentes vasoconstritores são preconizadas no intuito de evitar a vasoconstrição sistêmica disseminada e a redução da perfusão tecidual, uma vez que esta já é uma característica deletéria da sepse. Em nosso trabalho, assim como no de da Rosa Maggi Sant Helena (2015), a noradrenalina foi capaz de restaurar os níveis da pressão arterial, sendo que na maior dose, houve acentuada redução do fluxo sanguíneo renal com aumento da resistência vascular deste órgão. Desta maneira,

nosso trabalho visou investigar os efeitos destes vasoconstritores: vasopressina, noradrenalina e fenilefrina, além do potencial vasorrelaxante da acetilcolina, no leito vascular renal isolado, a fim de confrontar com os achados sistêmicos até aqui mostrados.

Diferente do que observamos *in vivo*, a avaliação da pressão de perfusão vascular renal (PPVR) basal, *in vitro*, mostrou-se reduzida no grupo CLP 6 horas quando comparada ao grupo controle. Os tempos intermediário e tardio (18 e 48 horas), não se mostraram diferentes do grupo controle. A capacidade de aumentar a pressão de perfusão vascular renal utilizando as distintas drogas já contextualizadas (vasopressina, noradrenalina e fenilefrina) também mostrou-se diferente quando comparada às respostas *in vivo*. As Figuras 21 a 24 mostram as ações destes fármacos durante a progressão da sepse ao choque séptico. Tanto na curva não cumulativa quanto na perfusão contínua de vasopressina houve aumento significativamente maior na pressão de perfusão vascular renal dos animais do grupo CLP 18 e 48 horas, quando comparados ao grupo controle. Estes nossos achados utilizando o modelo de CLP confirmam os resultados publicados em 2014 utilizando o modelo de endotoxemia por LPS (GUARIDO *et al.*, 2014). Já a resposta para a noradrenalina e para a fenilefrina foram reduzidas após a indução de sepse por CLP, em especial no grupo CLP 18 horas.

A busca por um agente ideal no tratamento da sepse faz-se necessária para melhora da sobrevida de pacientes acometidos por esta condição. Nós demonstramos que o uso da noradrenalina foi capaz de restaurar a pressão arterial sistêmica em doses muito elevadas, o que causou o aumento na pressão de perfusão renal e consequente redução do fluxo sanguíneo renal que pode ser considerada danosa ao leito vascular. Concomitantemente, a vasopressina parece restaurar a pressão arterial sistêmica na fase tardia da sepse, mas também predispõe a uma lesão renal aguda, levando em consideração o aumento da vasoconstrição que provocou em doses elevadas. Dellinger *et al.* (2013) já havia

preconizado o uso destas duas substâncias administradas conjuntamente, na tentativa de reduzir as doses necessárias de cada uma, sem causar lesões teciduais graves por hipóxia.

Ainda em relação a uma substância vasoconstritora ideal para o tratamento da sepse, o uso da fenilefrina já foi descrito e está indicado quando não há responsividade a outros agentes preconizados (DELLINGER *et al.*, 2013). Em nosso trabalho, doses intermediárias de fenilefrina tiveram pouco efeito na pressão arterial sistêmica. Contudo, comparada às demais substâncias avaliadas, não apresentou diferença significativa no aumento da pressão de perfusão vascular renal quando comparada ao controle (somente na perfusão contínua e no grupo CLP 18 horas), dado que sugere que a fenilefrina pode ser uma droga segura ao leito vascular renal tanto no início como na fase tardia da sepse.

Estudos direcionados às alterações no leito vascular renal durante a sepse ainda são escassos. Em um dos primeiros estudos realizados utilizando-se o modelo de endotoxemia (LPS) em coelhos, Li, Croce e Winquist (1992) demonstraram que leitos periféricos (artérias da orelha) se comportam de modo diferente de leitos de resistência (rim isolado). Ao utilizarem a noradrenalina como agente vasoconstritor, Li e colaboradores mostraram a ausência de hiporreatividade vascular renal. Também utilizando o modelo de endotoxemia induzida por LPS, nosso grupo de trabalho mostrou que o leito vascular renal apresenta aumento da reatividade à vasopressina 24 horas após a indução do choque, diferentemente do que acontece em anéis de aorta e na pressão arterial (GUARIDO *et al.*, 2014). Um outro trabalho recente do nosso grupo também mostrou não haver hiporesponsividade à fenilefrina, noradrenalina, angiotensina II e vasopressina em artéria renal obtida de animais dos grupos CLP 6 e 18 horas (BERNARDELLI *et al.*, 2016). Todas essas evidências, juntamente com os resultados apresentados e discutidos até aqui, nos levaram a questionar quais mecanismos poderiam estar

associados à manutenção da reatividade na fase inicial da sepse e ao aumento da reatividade à vasopressina, em especial nas fases intermediária e tardia da sepse induzida pelo modelo CLP.

Conforme descrito na introdução deste trabalho, é sabido que a manutenção do tônus vascular durante a sepse é o principal parâmetro preconizado pelo uso de agentes não farmacológicos e pelo emprego de substâncias vasoativas e cardiotônicas quando a terapia inicial é insatisfatória. Contudo, apesar de muitos estudos visarem a compreensão das escolhas acerca da terapia empregada, poucos deles ainda consideram importante entender os mecanismos pelos quais as substâncias vasoativas têm efeitos específicos em diferentes leitos vasculares. Neste contexto, a terceira parte do nosso trabalho buscou esclarecer as possíveis alterações nas vias de sinalização da vasopressina no leito vascular renal no decorrer da progressão do choque séptico, visto que estas modificações podem acarretar o comprometimento da função renal e comprometer a sobrevida do paciente séptico.

Em condições fisiológicas, a vasopressina circulante está presente no plasma humano em concentrações de 2-4 pg/ml sem, no entanto, causar aumento da pressão arterial. Sabe-se que é necessário um aumento em mais de 10 vezes nos níveis plasmáticos de vasopressina (~42 pg/ml) para se alcançar um aumento da pressão arterial de aproximadamente 5 mm Hg (COWLEY & BARBER, 1983). Seguindo este raciocínio, nós mostramos que na sepse experimental induzida pelo modelo de CLP, os animais apresentaram um pico significativo de vasopressina plasmática na 6ª hora após a CLP, com retorno aos níveis basais na 48ª hora analisada. Mesmo com esse aumento, de aproximadamente 8 vezes na concentração plasmática de AVP, nem a pressão arterial sistêmica e nem a pressão de perfusão vascular renal se mantiveram em valores normais ou acima do basal. Ao contrário, na 6ª hora, a redução da PPVR foi significativa no grupo CLP, sugerindo-nos que mecanismos de ação local (renal) poderiam estar alterados, quando a reatividade

vascular renal frente à administração de vasopressina exógena foi avaliada.

Já é bem descrito na literatura que a principal ação da vasopressina no controle do tônus vascular se dá através de seus receptores do tipo V2 localizados na membrana basolateral dos ductos coletores renais, promovendo a reabsorção de água (NODA *et al.*, 2010). Contudo, o papel dos receptores V1a vem sendo alvo de estudos, com a finalidade de compreender o seu papel também nestes mecanismos. Já mencionamos também, aqui nesta discussão, que Innamorati, Sadeghi e Birnbaumer (1998) mostraram que a liberação contínua de vasopressina com estimulação exacerbada dos receptores V1a era responsável pelo fenômeno de dessensibilização destes mesmos receptores.

O primeiro desenho experimental desta parte do estudo visou avaliar a participação (*up regulation* ou *down regulation*) dos receptores do tipo V1a na manutenção inicial (grupo CLP 6 horas) e no aumento da reatividade vascular renal à vasopressina 18 e 48 horas após a CLP. Observamos que o bloqueio dos receptores V1a utilizando o antagonista DTM-AVP causou uma redução significativa no aumento da pressão de perfusão induzido pela vasopressina em todos os grupos experimentais. Contudo avaliando de maneira minuciosa estes resultados, pode-se concluir que nos grupos CLP 18 e 48 horas essa redução foi maior em decorrência da hiper-reatividade observada nestes grupos CLP, o que resultou em uma resposta diminuída à vasopressina similar em todos os grupos experimentais. Para confirmar esses achados, nós realizamos uma imunoeletroforese para receptores V1a no córtex renal de animais controle e CLP 6 e 48 horas. E o resultado mostrado revela não haver diferença na expressão dos receptores de vasopressina nos grupos CLP, quando comparados ao grupo controle. Em conjunto, estes resultados mostraram que parece haver influência da atividade, mas não da expressão, dos receptores V1a no aumento da reatividade à vasopressina nas fases intermediária e tardia da sepse. Em condições fisiológicas,

Ostrowski *et al.* (1993) demonstraram haver a expressão de receptores de vasopressina V1a em diversas porções dos rins, como glomérulo, medula e vasos sanguíneos. Já na sepse, poucos estudos se propuseram a avaliar a expressão de receptores V1a em rins de animais submetidos aos modelos existentes. Diferentemente do que mostramos em nosso trabalho, Schmidt *et al.* (2008), utilizando camundongos da linhagem C57/BL6 e o modelo de ligadura e perfuração do ceco, mostraram uma redução na expressão de RNA mensageiro do receptor V1a no rim e no fígado destes animais 12 horas após a indução da sepse. A diferença nos tempos de análise e na espécie animal podem ser o motivo desta contradição entre nossos dados e o que já está descrito na literatura.

A fim de dar continuidade à nossa investigação, o próximo objetivo foi avaliar a participação da mobilização de cálcio intracelular no aumento da reatividade à vasopressina. A pesquisa básica, ao longo dos anos, vem demonstrando que a fosforilação reversível da cadeia leve de miosina regulada pela quinase e pela fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCK e MLCP, respectivamente) é o principal mecanismo que regula a contração do músculo liso, sendo essas conhecidas como via dependente e independente do cálcio (SWARD *et al.*, 2003). A resposta contrátil pode ocorrer por despolarização da célula muscular lisa ou ainda ser desencadeada por agonistas. A vasopressina, assim como a fenilefrina e a noradrenalina, é conhecida por, uma vez ligada ao seu receptor do tipo V1a (receptor acoplado à proteína Gq), desencadear uma série de eventos intracelulares que levam à contração do músculo liso vascular tanto de maneira dependente quanto de maneira independente de cálcio (BAUER & PAREKH, 2003; CAVARAPE *et al.*, 2003).

Os mecanismos de contração associados ao aumento de cálcio citosólico utilizam-se da abertura de canais de cálcio localizados na membrana plasmática da célula e da mobilização do cálcio liberado de organelas citoplasmáticas, dentre elas o

retículo sarcoplasmático. Nós investigamos ambos os mecanismos no aumento da reatividade vascular à vasopressina nos animais sépticos (Figuras 26 e 27). A participação do retículo sarcoplasmático no aumento do cálcio citosólico foi investigada através do protocolo anteriormente realizado em nosso laboratório em anéis de aorta, mas nunca havia sido realizado em rim isolado e perfundido. Para isto, o rim isolado de animais dos grupos controle e CLP (6, 18 e 48 horas) foram perfundidos com uma solução nutritiva e, após um período de perfusão, os mesmos rins foram perfundidos com solução nutritiva sem cálcio e contendo vasopressina. Nesta primeira parte do protocolo, avaliamos a área sobre a curva (AUC) induzida pelo aumento da pressão de perfusão vascular renal causada pela vasopressina. O que nós observamos foi que o grupo CLP 48 horas apresentou a área sob a curva da perfusão renal significativamente menor quando comparado ao grupo controle, o que nos sugeriu uma possível deficiência na maquinaria celular responsável pela liberação e/ou recaptação de cálcio do retículo. Para explorar a hipótese, nós realizamos imunoeletroforese de córtex renal para avaliar a expressão do receptor da proteína IP3 e a expressão da bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA do inglês, *Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*). Porém a expressão das proteínas analisadas não se mostrou diferente nos grupos CLP quando comparados ao grupo controle. Essa foi uma das limitações deste trabalho, pois além da falta da análise de alguns outros componentes da via como o receptor de rianodina e a expressão de proteínas como a fosfolipase  $\beta$  e a quinase de cadeia leve de miosina, a técnica e os anticorpos utilizados só nos mostram a expressão e não a atividade das proteínas analisadas.

Após a investigação da mobilização de cálcio via retículo sarcoplasmático, nós avaliamos o papel dos canais de cálcio da membrana plasmática na hiper-reatividade à vasopressina. Para isso, após a estabilização do rim isolado com PSS sem cálcio contendo vasopressina, uma curva dose-resposta não cumulativa para o  $\text{CaCl}_2$  foi realizada. Observamos nesses experimentos que



os rins obtidos do grupo CLP 18 horas foram os únicos a manter o aumento da reatividade à vasopressina após a restauração dos níveis de cálcio intracelulares. O cálcio tem papel fundamental em quase todos os processos biológicos. Deste modo, os níveis intracelulares deste íon é mantida estritamente por mecanismos regulatórios. Processos patológicos, como a sepse, podem causar prejuízos nestes mecanismos e levar a disfunções celulares e orgânicas. Um estudo clínico revelou que 71,7% dos pacientes sépticos avaliados apresentavam hipocalcemia, porém esta redução nos valores de cálcio não teve relação direta com o aumento no risco de mortalidade destes pacientes. Ao contrário, pacientes que receberam cálcio parenteral apresentaram maior risco de desenvolver disfunção renal aguda (COLLAGE *et al.*, 2013). Neste mesmo artigo publicado, os autores demonstraram, utilizando modelo de sepse induzida por CLP em camundongos, que a suplementação de cálcio aumentou o risco de mortalidade e a disfunção orgânica (renal e hepática) durante a sepse.

Apesar deste estudo de Collage e colaboradores (2013) não estabelecer uma correlação direta entre os níveis de cálcio e a mortalidade de pacientes sépticos, tem-se proposto que a deficiência na maquinaria intracelular do cálcio pode contribuir para a redução da reatividade vascular aos agentes vasoconstritores durante a sepse, visto que muitos destes agonistas utilizam-se da via do cálcio para seu mecanismo contrátil. A vasopressina também usa esta via através dos receptores V1a para sua ação constritora. Em uma revisão publicada em 2007, Barrett, Singer e Clapp relataram uma série de alterações promovidas pela sepse para tentar explicar o aumento da sensibilidade de células de músculo liso à vasopressina. Dentre elas o aumento no número ou afinidade da vasopressina pelos receptores V1a (ROTH & SPITZER, 1987; BUCHER *et al.*, 2002) e V2 (BERNARDICH *et al.*, 1998; O'BRIEN, CLAPP, SINGER, 2002; MORELLI *et al.*, 2004), a potencialização da via intracelular induzida pela ligação da vasopressina ao seu receptor, a inibição da NOS induzível (MOREAU *et al.*, 2002), o

fechamento de canais de potássio (WAKATSUKI, NAKAYA, INOUE, 1992; TSUCHIVA *et al.*, 2002), o aumento da atividade do sistema nervoso autônomo simpático (COWLEY, MONOS, GUYTON, 1974; MOHRIN *et al.*, 1980; NOGUERA *et al.*, 1997), entre outros. Nosso estudo mostrou que no leito vascular renal, esse aumento da sensibilidade à vasopressina exógena, não está relacionado à alteração na expressão de receptores V1a. Contudo, pelo menos em parte, pode ter alguma relação com a atividade dos receptores V1a nas fases intermediária e tardia da sepse; e com a mobilização de cálcio intracelular por aumento da atividade de canais de cálcio de membrana plasmática durante a fase intermediária da sepse.

Nós também realizamos o protocolo descrito acima para avaliar a reatividade à fenilefrina. Este desenho experimental foi proposto como um controle positivo do fenômeno que foi observado nos animais perfundidos com vasopressina. Tanto a avaliação da participação do cálcio intracelular proveniente do retículo quanto o envolvimento dos canais de cálcio presentes na membrana plasmática mostraram não influenciar na reatividade da fenilefrina no rim isolado e perfundido de animais sépticos. E em especial, esses dados nos mostram que apesar de ambas as substâncias testadas (vasopressina e fenilefrina) apresentarem vias de sinalização intracelular semelhantes (via da fosfolipase C $\beta$ ), se comportam de maneiras distintas no rim de animais CLP. Prova disto, é que um estudo realizado em 1988, comparando a ativação da via do cálcio pela vasopressina e pela noradrenalina, mostrou que contração promovida pela vasopressina é mais depende da entrada do cálcio pelos canais de membrana, enquanto a indução pela noradrenalina depende mais do cálcio liberado do retículo endoplasmático (CAUVIN *et al.*, 1988). Este resultado com a fenilefrina, em especial, serviu para confirmar que o leito vascular renal apresenta alguma peculiaridade em resposta à administração exógena de AVP durante a sepse e que esta parece envolver mais do que uma alteração generalizada promovida pela sepse. Por isso, o último passo da investigação

dos mecanismos envolvidos na hiper-reatividade à vasopressina no leito vascular renal durante a progressão da sepse foi avaliar a participação da via Rho-A/Rho-quinase.

A história das pequenas proteínas G, e em especial da Rho-A e sua molécula efetora ROCK, é bastante recente, conforme citamos na introdução deste documento. Com o passar dos anos, diversos estudos mostraram sua importância em processos fisiológicos associados ao crescimento celular, proliferação celular, participação na adesão e migração celular e ainda manutenção da resposta contrátil da musculatura lisa (RIENTO & RIDLEY, 2003). Através desse conhecimento, houve um aumento no número de evidências básicas e clínicas na relevância desta via em patologias como a falência cardíaca congestiva, aterosclerose e hipertensão (CAI, LI & ZHOU, 2016). Até o presente momento, poucos pesquisadores se propuseram a investigar essa correlação na sepse, mostrando o quanto ainda é ampla a lacuna das perguntas acerca da via Rho-A/Rho-quinase nesta patologia.

Ao observar os dados apresentados na Figura 31, em um primeiro momento nossos resultados parecem somente demonstrar que na maior concentração do inibidor da enzima Rho-quinase, o composto Y-27632, houve uma redução significativa da AUC induzida pela administração de vasopressina em todos os grupos experimentais. Mas observando ambos os gráficos, de aumento da pressão de perfusão vascular renal (Figura 30) e da análise da área sob a curva (Figura 31), podemos notar que a maior concentração de Y-27632 foi capaz de abolir a hiper-reatividade dos grupos CLP 18 e 48 horas, para todas as doses de vasopressina utilizadas. Além disso, nós também avaliamos a expressão das proteínas relacionadas à via Rho-A/Rho-quinase. Ambas, ROCK I e pMYPT1 (Thr 696) estavam aumentadas no grupo CLP 48 horas. Resultados semelhantes foram descritos por Guarido *et al.* (2014).

Mudanças na atividade e na sinalização da via Rho-A/Rho-quinase, também conhecida como via de sensibilização ao cálcio, têm sido propostas como fatores contribuintes para algumas alterações cardiovasculares encontradas durante a progressão da sepse. Alguns autores têm investigado o papel da modulação da Rho-A na via de sinalização do óxido nítrico. Da Silva-Santos *et al.* (2009) mostraram que a hiporreatividade à fenilefrina em pequenas artérias mesentéricas é modulada pela via do GMP cíclico, apesar do aumento da expressão e atividade de proteínas da via da Rho-A/Rho-quinase. Indo ao encontro destes dados, Liao *et al.* (2013) mostraram que tanto *in vivo* quanto *in vitro* a administração de LPS causa a redução da reatividade à noradrenalina, em especial no que chamaram de fase tardia da endotoxemia (6 horas após a administração de LPS). Eles demonstraram que estas alterações estão associadas ao aumento da atividade e expressão da iNOS e supressão na atividade da MYPT1 fosforilada no resíduo 696. Em nosso trabalho, não investigamos o papel da modulação do NO no leito vascular renal apesar dos nossos resultados mostrarem que em 48 horas após a indução da sepse pelo modelo de CLP, os níveis de NO plasmático ainda estão elevados. Faz-se necessário avaliar os níveis de NO e a expressão das enzimas iNOS e eNOS no rim dos animais dos grupos CLP para fazer essa possível correlação.

O envolvimento da via Rho-A/Rho-quinase na reatividade a alguns vasoconstritores utilizados na sepse já foi descrito. Porém pouco se sabe ainda sobre a implicância desta via no efeito benéfico ou deletério do uso da vasopressina. Nós conseguimos demonstrar que o aumento na expressão de algumas das proteínas da via, ROCK I e pMYPT1 contribui para o aumento da reatividade à vasopressina encontrada nos animais dos grupos CLP 48 horas. Além disso, é possível que as menores doses de vasopressina utilizadas no início da sepse tenham efeito benéfico no tratamento desta patologia, sem causar danos severos ao leito vascular renal. Em contrapartida, seu uso em doses elevadas e nos períodos mais tardios deve ser preconizada com cautela,

principalmente por seu efeito exacerbado que pode levar à falência renal aguda.



## 7. Conclusão

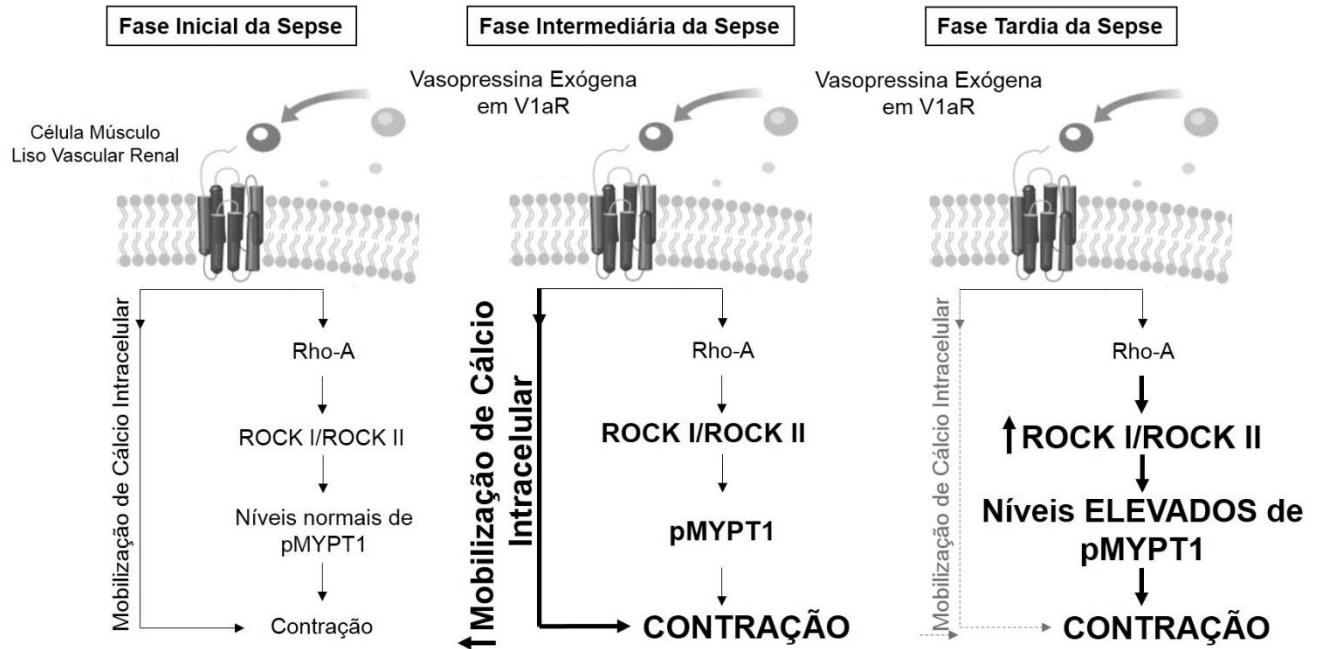
Em sumário nossos dados mostraram que:

- I. O modelo de sepse induzido por CLP utilizado para a realização deste estudo reproduz as alterações cardiovasculares, hematológicas e renais observadas na sepse em humanos, o que reforça a relevância do mesmo para estudos acerca desta condição clínica;
- II. Animais sépticos apresentam perfil de resposta variável à vasopressina: elevam pouco a pressão arterial na fase inicial da sepse, retornando a níveis similares aos do grupo controle nas fases intermediária e tardia, quando analisados pela medida pressão arterial em ratos anestesiados;
- III. A vasopressina plasmática endógena também tem um perfil variável na sepse, acompanhando as alterações de responsividade à vasopressina exógena observadas no sistema cardiovascular pela metodologia de pressão arterial em ratos anestesiados;
- IV. O leito vascular renal se comporta de maneira única aos diferentes agentes vasoconstritores utilizados neste trabalho, em especial à vasopressina. Os rins apresentam-se hiper-reativos à AVP, causando o aumento da pressão de perfusão vascular renal e a redução do fluxo sanguíneo renal;
- V. Alterações na atividade e densidade dos receptores V1a e V2 não parecem ser a causa da hiper-reatividade vascular renal à vasopressina nos estágios intermediário e tardio da sepse;
- VI. A via de sinalização intracelular dependente de cálcio parece estar alterada nos tempos 18 e 48 horas após a sepse, porém também parece ter alguma relevância na hiper-reatividade à vasopressina somente na fase intermediária da sepse;

- VII. A via Rho-A/Rho-quinase, por sua vez, mostrou-se mais expressa e mais ativa nas fases intermediárias (dados não significativos) e tardia da sepse, participando do efeito exacerbado da vasopressina no leito vascular renal 48 horas após a indução da sepse.

Em conjunto, nossos resultados demonstraram que a hiperreatividade vascular à vasopressina parece ser uma condição do sistema renal e que esta parece estar relacionada em maior parte pelo aumento da atividade da via Rho-A/Rho-quinase. A fim de exemplificar de maneira didática nossa conclusão, a figura a seguir (Figura 34) visa representar, em uma célula de músculo liso do leito vascular renal, a particularidade deste órgão no aumento da resposta à vasopressina, e a participação das vias intracelulares do cálcio e da Rho-A/Rho-quinase nestes achados.





**Figura 34:** Representação esquemática da atividade da via intracelular do cálcio e do aumento da atividade e expressão das proteínas da via da Rho-A/Rho-quinase no aumento da reatividade vascular renal à vasopressina exógena nos estágios intermediário e tardio da sepse.



## 8. Referências Bibliográficas

ABDELRAHMAN RS, EL-AWADY MS, NADER MA *et al.* Hydrogen sulfide ameliorates cardiovascular dysfunction induced by cecal ligation and puncture in rats. **Human and Experimental Toxicology**, 34(10):953-964, 2015.

ANGUS DC, LINDE-ZWIRBLE WT, LIDICKER J *et al.* Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**, 29 (7):1303-1310, 2001.

ARNOLD WP, MITTAL CK, KATSUKI S, MURAD F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3',5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 74(8):3203–3207, 1977.

BARRETT LK, SINGER M, CLAPP LH. Vasopressin: Mechanisms of action on the vasculature in health and in septic shock. **Critical Care Medicine**, 35(1):33-40, 2007.

BAUER J, PAREKH N. Variations in cell signaling pathways for different vasoconstrictor agonists in renal circulation of the rat. **Kidney International**, 63(6):2178-2186, 2003.

BERNARDELLI AK, FONSECA DA SILVA RCMVA, CORREA T *et al.* Vasoplegia in sepsis depends on vascular system, vasopressor, and time point: a comparative evaluation in vessels from rats subjected to the cecal ligation puncture model. **Canadian Journal of Pharmacology**, 2016 [artigo submetido].

BERNARDICH C, BANDI JC, MELIN P *et al.* Effects of F-180, a new selective vasoconstrictor peptide, compared with terlipressin and vasopressin on systemic and splanchnic hemodynamics in a

rat model of portal hypertension. **Hepatology**, 27(2):351–356, 1998.

BIRNBAUMER M, SEIBOLD A, GILBERT S *et al.* Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone. **Nature**, 357(6376):333–335, 1992.

BOFFA J-J, ARENDSHORST WJ. Maintenance of Renal Vascular Reactivity Contributes to Acute Renal Failure during Endotoxemic Shock. **Journal of the American Society of Nephrology**, 16(1):117–124, 2005.

BOFFA J-J, JUST A, COFFMAN TM *et al.* Thromboxane receptor mediates renal vasoconstriction and contributes to acute renal failure in endotoxemic mice. **Journal of the American Society of Nephrology**, 15(9):2358–2365, 2004.

BONE RC, BLAK RA, CERRA FB *et al.* Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. **Chest**, 101(6):1644-1655, 1992.

BOURNE HR, SANDERS DA, MCCORMICK F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. **Nature** 348(6297):125–132, 1990.

BRACKETT DJ, SCHAEFER CF, TOMPKINS P *et al.* Evaluation of cardiac output, total peripheral vascular resistance, and plasma concentrations of vasopressin in the conscious, unrestrained rat during endotoxemia. **Circulatory Shock**, 17(4):273-284, 1985.

BRACKETT DJ, SCHAEFER CF, WILSON MF. The role of vasopressin in the maintenance of cardiovascular function during early endotoxin shock. **Advances in Shock Research**, 9:147-156, 1983.

BRYAN NS, GRISHAM MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology and Medicine**, 43(5):645-657, 2007.

BUCHER M, HOBBAHN J, KURTZ A. Nitric oxide-dependent down-regulation of angiotensin II type 2 receptors during experimental sepsis. **Critical Care Medicine**, 29(9):1750-1755, 2001.

BUCHER M, HOBBAHN J, TAEGER K *et al.* Cytokine-mediated downregulation of vasopressin V(1A) receptors during acute endotoxemia in rats. **American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 282(4):R979–R984, 2002.

BURAS JA, HOLZMANN B, SITKOVSKY M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nature Reviews**, 4(10):854-865, 2005.

CAI A, LI L, ZHOU Y. Pathophysiological effects of RhoA and Rho-associated kinase on cardiovascular system. **Journal of Hypertension**, 34(1):3-10, 2016.

CAUVIN C, WEIR SW, WALLNOFER A *et al.* Agonist-induced activation of rat mesenteric resistance vessels: Comparison between noradrenaline and vasopressin. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, 12(Suppl 5):S128–S133, 1988.

CAVARAPE A, BAUER J, BARTOLI E *et al.* Effects of angiotensin II, arginine vasopressin and tromboxane A2 in renal vascular bed: role of rho-kinase. **Nephrology Dialysis Transplantation**, 18(9):1764-1769, 2003.

CHEN W, LIU DJ, HUO *et al.* Reactive Oxygen Species Are Involved in Regulating Hypocontractility of Mesenteric Artery to Norepinephrine in Cirrhotic Rats with Portal Hypertension.

**International Journal of Biological Sciences**, 10(4):386-395, 2014.

CHIEN UH, LAI M, SHIH TY *et al.* Heteroduplex analysis of the sequence relationships between the genomes of Kirsten and Harvey sarcoma viruses, their respective parental murine leukemia viruses, and the rat endogenous 30S RNA. **Journal of Virology**, 31(3):752–760, 1979.

CLOWES GHA, ZUSCHNEID W, TURNER M *et al.* Observations on the pathogenesis of the pneumonitis associated with severe infection in other parts of the body. **Annals of Surgery**. 167(5):630-650, 1968.

COLLAGE RD, HOWELL GM, ZHANG X *et al.* Calcium Supplementation During Sepsis Exacerbates Organ Failure and Mortality via Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase Signaling. **Critical Care Medicine**, 41(11):e352–e360, 2013.

COHEN J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, 420(6917):19-26, 2002.

COWLEY AW Jr, BARBER BJ. Vasopressin vascular and reflex effects—a theoretical analysis. **Progress in Brain Research**, 60:415–424, 1983.

COWLEY AW Jr, MONOS E, GUYTON AC. Interaction of vasopressin and the baroreceptor reflex system in the regulation of arterial blood pressure in the dog. **Circulation Research**, 34(4):505–514, 1974.

CUPPLER WA, BRAAM B. Assessment of renal autoregulation. **American Journal of Renal Physiology**, 92(4):F1105-1123, 2007.

DA ROSA MAGGI SANT HELENA B, GUARIDO KL, DE SOUZA P *et al.* Reduction in renal blood flow following administration of norepinephrine and phenylephrine in septic rats treated with Kir6.1 ATP-sensitive and KCa1.1 calcium-activated K<sup>+</sup> channel blockers. **European Journal of Pharmacology**, 15(765):42-50, 2015.

DA ROSA MAGGI SANT HELENA B. **Efeitos de bloqueadores de canais de potássio na reatividade vascular renal durante a sepse em ratos.** 2015. p.104. Tese (doutorado). Universidade Federal do Paraná. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Farmacologia. Curitiba, Paraná, 2015.

DA SILVA FP & VELASCO IT. **Sepse.** Editora Manole, 1. ed. São Paulo, 2007.

DA SILVA-SANTOS JE, CHIAO CW, LEITE R *et al.* The Rho-A/Rho-kinase pathway is up-regulated but remains inhibited by cyclic guanosine monophosphate-dependent mechanisms during endotoxemia in small mesenteric arteries. **Critical Care Medicine**, 37(5):1716-1723, 2009.

DA SILVA-SANTOS JE, ASSREUY J. Long-lasting changes of rat blood pressure to vasoconstrictors and vasodilators induced by nitric oxide donor infusion: involvement of potassium channels. **Journal of Pharmacology Experimental and Therapeutic**, 290(1):380-387, 1999.

DA SILVA-SANTOS. **Envolvimento do óxido nítrico e de canais de potássio nas alterações da reatividade vascular em modelos experimentais de sepse.** 2003. p. 152. Tese (doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmacologia. Florianópolis, Santa Catarina, 2003.

DE SOUZA P, GUARIDO KL, SCHESCHOWITSCH K *et al.* Impaired vascular function in sepsis-surviving rats: evidence for

endothelial dysfunction mediated by angiotensin II, increased ROS/RNS generation and augmented activity of Rho-Kinase. **Critical Care Medicine**, 2015 [artigo submetido].

DEJAGER L, PINHEIRO I, DEJONCKHEERE E *et al.* Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends in Microbiology**, 19(4):198-208, 2011.

DELLINGER RP, CARLET JM, MASUR H *et al.* Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. **Critical Care Medicine**, 32(3):858-73, 2004.

DELLINGER RP, LEVY MM, CARLET JM *et al.* Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. **Critical Care Medicine**, 36(1):296-327, 2008.

DELLINGER RP, LEVY MM, RHODES A *et al.* Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. **Critical Care Medicine**, 41(2):580–637, 2013.

DINARELLO CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Chest**, 112 (6 Suppl):321-329, 1997.

FERNANDES D, ASSREUY, J. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. **Shock**, 30(7):10-13, 2008.

FINLEY JJ, KONSTAM MA, UDELSON JE. Arginine Vasopressin Antagonists for the Treatment of Heart Failure and Hyponatremia. **Circulation**, 118(4):410-421, 2008.



FLYNN A, CHOKKALINGAM MB, MATHER PJ. Sepsis-induced cardiomyopathy: a review of pathophysiologic mechanisms. **Heart Failure Reviews**, 15(6):605-11, 2010.

FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells and the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288:373-376, 1980.

GONÇALVES RPM, GUARIDO KL, ASSEREUY J *et al.* Gender-Specific Differences in the in situ cardiac Function of Endotoxemic Rats Detected by Pressure-Volume Catheter. **Shock**, 42(5):415-423, 2014.

GONÇALVES RPM. **Função e reatividade cardíaca in situ na sepse em ratos: diferenças entre gêneros e modelos experimentais**. 2014. p.172. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Farmacologia. Florianópolis, Santa Catarina, 2014.

GUARIDO KL, GONÇALVES RPM, GASPAROTTO Jr A *et al.* Increased Activation of the Rho-A/Rho-Kinase Pathway in the Renal Vascular System Is Responsible for the Enhanced Reactivity to Exogenous Vasopressin in Endotoxemic Rats. **Critical Care Medicine**, 42(6):461-471, 2014.

GUYTON AC. Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. **Science**, 252(5014):1813-6, 1991.

HALL A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. **Science**, 279(5350):509-514, 1998.

HALL A. The cellular functions of small GTP-binding proteins. **Science**, 249(4969):635-640, 1990.

HISAOKA T, YANO M, OHKUSA T, *et al.* Enhancement of Rho/Rho-kinase system in regulation of vascular smooth muscle contraction in tachycardia-induced heart failure. **Cardiovascular Research**, 49(2):319–329, 2001.

HOLLENBERG SM, BROUSSARD M, OSMAR J *et al.* Increased microvascular reactivity and improved mortality in septic mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Circulation Research**, 86(7):774-8, 2000.

HOLMES CL, PATEL BM, RUSSEL JA *et al.* Physiology of Vasopressin Relevant to Management of Septic Shock. **Chest**, 120(3):989 –1002, 2001.

HONG F, HALDERAN BD, JACKSON D *et al.* Biochemistry of smooth muscle myosin light chain kinase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 510(2):135-146, 2011.

HUBBARD WJ, CHOUDHRY M, SCHWACHA MG *et al.* Cecal ligation and puncture. **Shock**, 24(Suppl. 1):52–57, 2005.

IGNARRO LJ, BYRNS RE, BUGA GM *et al.* Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide. **Circulation Research**, 61(6):866–879, 1987.

INNAMORATI G, SADEGHI H, BIRNBAUMER M. Transient phosphorylation of the V1a vasopressin receptor. **Journal of Biological Chemistry**, 273(12):7155–7161, 1998.

ISHIZAKI T, MAEKAWA M, FUJISAWA K *et al.* The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. **EMBO Journal**, 15(8):1885–1893, 1996.

JI Y, REN X, ZHAO Y *et al.* Role of intracardiac angiotensin II in cardiac dysfunction of rat during septic shock. **Chinese Medical Journal**, 109(11):864-867, 1996.

KAUSS IAM, GRION CMC, CARDOSO LTQ *et al.* The epidemiology of sepsis in a Brazilian teaching hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 14(3):264-270, 2010.

KILBOURN RG, GROSS SS, JUBRAN A *et al.* NG-Methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: Implications for the involvement of nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 87(9):3629-3632, 1990.

KIM HW, GREENBURG AG. Nitric oxide scavenging, alone or with nitric oxide synthesis inhibition, modulates vascular hyporeactivity in rats with intraperitoneal sepsis. **Shock**, 17(5):423-426, 2000.

KNOCK GA, SNETKOV VA, SHAIPTA Y *et al.* Superoxide constricts rat pulmonary arteries via Rho-kinase-mediated Ca(2+) sensitization. **Free Radical Biology and Medicine**, 46(5):633–642, 2009.

KUMAR G, KUMAR N, TANEJA A *et al.* Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007). **Chest**, 140(5):1223–1231, 2011.

LEONE M, BOYLE WA. Decreased vasopressin responsiveness in vasodilatory septic shock-like conditions. **Critical Care Medicine**, 34(4):1126–1130, 2006.

LEUNG T, CHEN XQ, MANSER E *et al.* The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. **Molecular and Cellular Biology**, 16(10):5313–5327, 1996.

LI T, CROCE K, WINQUIST RJ. Regional Differences in the Effects of Septic Shock On Vascular Reactivity in the Rabbit. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 261(3):959-963, 1992.

LI WJ, PARK K, PAICK JS *et al*. Chronic treatment with an oral rho-kinase inhibitor restores erectile function by suppressing corporal apoptosis in diabetic rats. **Journal of Sexual Medicine**, 8(2):400-410, 2011.

LI Z, CHENG L, LIANG H *et al*. GPER inhibits diabetes-mediated RhoA activation to prevent vascular endothelial dysfunction. **European Journal of Cell Biology**, 95(2):100-113, 2016.

LIAO M-H, SHIH C-C, TSAO C-M *et al*. RhoA/Rho-Kinase and Nitric Oxide in Vascular Reactivity in Rats with Endotoxaemia. **Plos One**, 8(2):e56331-e56345, 2013.

LOPES JA, JORGE S. The RIFLE and AKIN classifications for acute kidney injury: a critical and comprehensive review. **Clinical Kidney Journal**, 6(1):8-14, 2013.

LOUTZENHISER R, GRIFFIN K, WILLIAMSON G *et al*. Renal autoregulation: new perspectives regarding the protective and regulatory roles of the underlying mechanisms. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. 290(5):1153-1167, 2006.

LUNDBERG JO, GLADWIN MT, WEITZBERG E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. **Nature**, 14(9):623-41, 2015.

MADAULE P, AXEL R. A novel ras-related gene family. **Cell** 41(1):31–40, 1985.

MARTIN GS, MANNINO DM, EATON S *et al.* Epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **The New England Journal of Medicine**, 348(16):1546-1554, 2003.

MATSUDA N, HATTORI Y, AKAISHI Y *et al.* Impairment of cardiac beta-adrenoceptor cellular signaling by decreased expression of G(s alpha) in septic rabbits. **Anesthesiology**, 93(6):1465-73, 2000.

MEYER J, LENTZ CW, STOTHERT JC Jr *et al.* Effects of nitric oxide synthesis inhibition in hyperdynamic endotoxemia. **Critical Care Medicine**, 22(2):306-12, 1994.

MEYER-LINDENBERG A, DOMES G, KIRSCH P *et al.* Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. **Nature Reviews Neuroscience**, 12:524-538, 2012.

MOHRING J, GLANZER K, MACIEL JA Jr *et al.* Greatly enhanced pressor response to antidiuretic hormone in patients with impaired cardiovascular reflexes due to idiopathic orthostatic hypotension. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, 2(4):367–376, 1980.

MOREAU R, BARRIERE E, TAZI KA *et al.* Terlipressin inhibits in vivo aortic iNOS expression induced by lipopolysaccharide in rats with biliary cirrhosis. **Hepatology**, 36(5):1070–1078, 2002.

MOREL A, O'CARROLL AM, BROWNSTEIN MJ *et al.* Molecular cloning and expression of a rat V1a arginine vasopressin receptor. **Nature**, 356(6369):523–526, 1992.

MORELLI A, ROCCO M, CONTI G *et al.* Effects of terlipressin on systemic and regional haemodynamics in catecholamine-treated hyperkinetic septic shock. **Intensive Care Medicine**, 30(4):597–604, 2004.

NAVAR G. The role of kidneys in hypertension. **The Journal of Clinical Hypertension**, 7(9):542-549, 2005.

NODA Y, SOHARA E, OHTA E *et al.* Aquaporins in kidney pathophysiology. **Nature Reviews Nephrology**, 6(3):168–178, 2010.

NOGUERA I, MEDINA P, SEGARRA G *et al.* Potentiation by vasopressin of adrenergic vasoconstriction in the rat isolated mesenteric artery. **British Journal of Pharmacology**, 122(3): 431–438, 1997.

O'BRIEN A, CLAPP L, SINGER M. Terlipressin for norepinephrine-resistant septic shock. **Lancet**, 359(9313):1209–1210, 2002.

OSTROWSKI NL, YOUNG WS, KNEPPER MA *et al.* Expression of vasopressin V1a and V2 receptor messenger ribonucleic acid in the liver and kidney of embryonic, developing, and adult rats. **Endocrinology**, 133(4):1849–1859, 1993.

PETROS A, BENNETT D, VALLANCE P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. **Lancet**, 338(8782-8783):1557-1558, 1991.

PLAKATI M, KASHANI K, CABELLO-GARZA J *et al.* Predictors of acute kidney injury in septic shock patients: an observational cohort study. **Clinical Journal of American Society Nephrology**, 6(7):1744-1751, 2011.

PUETZ S, LUBOMIROV LT, PFITZER G. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. **Physiology**, 24, 342-356, 2009.

REEVES WB, BICHET DG, ANDREOLI TE. Posterior pituitary and water metabolism. *In*: WILSON JD, FOSTER DW, KRONENBERG

HM *et al.* **Williams Textbook of Endocrinology**, 9th ed. Philadelphia:WB Saunders, 341-388, 1998.

REGUEIRA T, ANDRESSEN M, MERCADO M *et al.* Physiopathology of acute renal failure during sepsis. **Medicina Intensiva**, 35(7):424-432, 2011.

RIENTO K, RIDLEY AJ. ROCKS: multifunctional kinases in cell behavior. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 4(6):446-456, 2003.

RITTIRSCH D, HUBER-LANG MS, FLIERL MA *et al.* Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature Protocols**, 4(1):31-36, 2009.

ROBERTSON CM, COOPERSMITH GM. The systemic inflammatory response syndrome. **Microbes and Infection**, 8(5):1382-1389, 2006.

ROCHA JL, FRIEDMAN E, BOSON WL *et al.* Diabetes Insipidus Nefrogênico: Conceitos Atuais de Fisiopatologia e Aspectos Clínicos. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, 44(4):290-299, 2000.

ROTH BL, SPITZER JA. Altered hepatic vasopressin and alpha 1-adrenergic receptors after chronic endotoxin infusion. **American Journal of Physiology**, 252(5 Pt1 ):E699–E702, 1987.

SALES Jr JAL, DAVID CM, HATUM R *et al.* Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepse em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**; 18(1):9-17, 2006.

SCHALLER MD, WAEBER B, NUSSBERGER J *et al.* Angiotensin II, vasopressin, and sympathetic activity in conscious rats with

endotoxemia. **American Journal of Physiology**, 249(6 Pt 2):H1086–H1092, 1985.

SCHMIDT C, HÖCHERL K, KURT B *et al.* Role of nuclear factor- $\kappa$ B-dependent induction of cytokines in the regulation of vasopressin V1A-receptors during cecal ligation and puncture-induced circulatory failure. **Critical Care Medicine**, 36(8):2363–2372, 2008.

SCHOTTMUELLER H. Wesen und Behandlung der Sepsis. *In*: VINCENT JL. Clinical sepsis and septic shock—definition, diagnosis and management principles. **Langenbecks Archives of Surgery**, 393(6):817–824, 2008.

SHARSHAR T, BLANCHARD A, PAILLARD M *at al.* Circulating vasopressin levels in septic shock. **Critical Care Medicine**, 31(6):1752–1758, 2003.

SHIH TY, WILLIAMS DR, WEEKS MO *et al.* Comparison of the genomic organization of Kirsten and Harvey sarcoma viruses. **Journal of Virology**, 27(1):45–55, 1978.

SOMLYO AP, SOMLYO AV.  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiology Review**, 83(4):1325–1358, 2003.

SWÄRD K, MITA M, WILSON DP *et al.* The role of RhoA and Rho-associated kinase in vascular smooth muscle contraction. **Current Hypertension Reports**, 5(1):66–72, 2003.

SUGIMOTO T, SAITO M, MOCHIZUKI S *et al.* Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding the human V1b vasopressin receptor. **Journal of Biological Chemistry**, 269(43): 27088–27092, 1994.



TAAL MW, CHERTOW G, MARSDEN PA *et al.* **Brenner & Rector's: The kidney**. 9 ed. Philadelphia: Elsevier, 2012.

TAKAI Y, KAIBUCHI K, KIKUCHI A *et al.* Small GTP-binding proteins. **Physiology Review**, 81(1):153-208, 2001.

THIEMERMANN C, SZABO C, MITCHELL JA *et al.* Vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents and hemodynamic decompensation in hemorrhagic shock is mediated by nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 90(1):267-71, 1993.

TÖLLE M, SCHUCHARDT M, WIEDON A *et al.* Differential effects of uridine adenosine tetraphosphate on purinoceptors in the rat isolated perfused kidney. **British Journal of Pharmacology**, 161(3): 530–540, 2010.

TSUCHIYA M, TSUCHIYA K, MARUYAMA R *et al.* Vasopressin inhibits sarcolemmal ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels via V1 receptors activation in the guinea pig heart. **Circulation Journal**, 66(3):277–282, 2002.

UEHATA M, ISHIZAKI T, SATOH H *et al.* Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. **Nature**, 389(6654):990-4, 1997.

VAN NIEUW AGP, VERMEER MA, VAN HINSBERGH VW. Role of RhoA and Rho kinase in lysophosphatidic acid-induced endothelial barrier dysfunction. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 20(12):E127–133, 2000.

VINCENT, JL. Clinical sepsis and septic shock—definition, diagnosis and management principles. **Langenbecks Archives of Surgery**, 393(6):817–824, 2008.

WAKATSUKI T, NAKAYA Y, INOUE I. Vasopressin modulates K(+)-channel activities of cultured smooth muscle cells from porcine coronary artery. **American Journal of Physiology**, 263(2 Pt 2):H491–H496, 1992.

WALL BM, RUNYAN KR, WILLIAMS HH *et al.* Characteristics of vasopressin release during controlled reduction in arterial pressure. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, 124(4):554–563, 1994.

WIBBERLEY A, CHEN Z, HU E *et al.* Expression and functional role of Rho-kinase in rat urinary bladder smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, 138(5):757–766, 2003.

WICHTERMANN KA, BAUE AE, CHAUDRY IH. Sepsis and septic shock-a review of laboratory models and a proposal. **Journal of Surgery Research**, 29(2):189-201, 1980.

WILSON DP, SUTHERLAND C, WALSH MP. Ca<sup>2+</sup> activation of smooth muscle contraction: evidence for the involvement of calmodulin that is bound to the triton insoluble fraction even in the absence of Ca<sup>2+</sup>. **Journal of Biological Chemistry**, 277(3): 2186–2192, 2002.

WRIGHT CE, REES DD, MONCADA S. The protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. **Cardiovascular Research**, 26(1):48-57, 1992.

ZHOU Q, MEI Y, SHOJI T *et al.* Rho-associated coiled-coil-containing kinase 2 deficiency in bone marrow-derived cells leads to increased cholesterol efflux and decreased atherosclerosis. **Circulation**, 126(18):2236-2247, 2012.

ZHU X, LIN H, JIANG R *et al.* Improving erectile function of spontaneously hypertensive rats by silencing ROCK2. **Urology**, 84(4):983.e11-8, 2014.